

MIKROIONTOPHORETISCHE
UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE WIRKUNG
VON ANTICONVULSIVA
AUF KORTIKALE NEURONE
DER RATTE IN VIVO

Johannes Vogler



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0063

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

Direktor: Professor Dr. D. Floog

Klinische Neuropfarmakologie

Leiter: Professor Dr. W. Zieglgänsberger

**MIKROIONTOPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE WIRKUNG VON ANTICONVULSIVA
AUF KORTIKALE NEURONE DER RATTE IN VIVO**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Vogler

aus

Duisburg

1986

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Berichterstatter: Professor Dr. med. W. Zieglgänsberger

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. H. Heinemann

Professor Dr. med. H. Hippig

Dekan: Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Oktober 1986

INHALT

I. EINLEITUNG

1. Einführung
2. Aufgabenstellung
3. Die klinische Bedeutung von
 - a) Carbamazepin
 - b) Valproat
 - c) Benzodiazepinen
 - d) Ro 15-1788
 - e) Progabide

II. METHODE

1. Tierpräparation
2. Cytoarchitektur des Kortex
3. Mikroiontophorese
 - a) Prinzip der Mikroiontophorese
 - b) Quantitative Aspekte der Mikroiontophorese
 - c) Die technische Realisation der Mikroiontophorese
 - d) Elektroosmose
 - e) Quantitative Aspekte der Elektroosmose
4. Pneumatische Applikation (Mikrosuperfusion)
 - a) Quantitative Aspekte
 - b) Technische Realisation der Mikrosuperfusion

5. Herstellung der Mikroelektroden

- a) Mehrfachpipetten
- b) Füllen der Mikropipetten
- c) Verwendete Substanzlösungen
- d) Kontrolle der Mikropipetten

6. Aufbau des Meßstandes

7. Aufzeichnung und Analyse der Daten

III. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der Untersuchungen mit Carbamazepin

2. Die Wirkung von Valproat

3. Die Wirkung von Progabide

4. Die Wirkung von Chlordiazepoxid

5. Die Wirkung von Midazolam

- a) pneumatische Applikation
- b) systemische Applikation

6. Die Wirkung von Ro 15-1788

IV. DISKUSSION

1. Carbamazepin und seine hemmende Wirkung auf L-Glu und GABA

2. Die neurophysiologischen und neurochemischen Wirkungsmechanismen von Valproat

3. Wirkungen von Progabide

4. Die Wirkung der Benzodiazepine Chlordiazepoxid und Midazolam auf neokortikale Neurone

5. Die Toleranzentwicklung kortikaler Neurone gegenüber
Benzodiazepinen

V. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Danksagung

Literaturverzeichnis

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

I.1. Einführung

Die Mechanismen, durch die antiepileptisch wirksame Pharmaka ihre Wirkungen auf das zentrale Nervensystem entfalten, sind noch weitgehend ungeklärt. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Wechselwirkungen von Carbamazepin, Valproat, Progabide und Benzodiazepinen (Midazolam und Chlordiazepoxid) mit Gamma-amino-buttersäure (GABA) und L-Glutamat (L-Glu) an Einzelzellen des Rattenkortex in vivo untersucht.

Im Zentralnervensystem von Vertebraten gilt GABA als einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter. Diese Aminosäure kommt in 40% aller synaptischen Verbindungen des zentralen Nervensystems vor (Enna und Gallagher, 1983; Fonnum und Storm-Mathiesen, 1978). Die Bedeutung von GABA als Neurotransmitter zeigt sich darin, daß bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie z.B. Epilepsie, Chorea Huntington und Parkinsonismus, pathologische Veränderungen des GABAergen Systems nachgewiesen werden konnten (Tower, 1976). Biochemische und neurophysiologische Befunde weisen darauf hin, daß antikonvulsiv wirkende Medikamente, wie z.B. Benzodiazepine und Progabide, am GABA-Rezeptorkomplex binden und die Wirkung von endogen freigesetztem GABA am postsynaptischen Neuron verstärken (Haefely, 1983).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen besitzen neben ihrer antikonvulsiven Wirkung auch ein antimanisches Wirkungsspektrum, das z.Zt. in mehreren klinischen Untersuchungen überprüft wird (siehe: Emrich und Mitarbeiter, 1984). Außer im Neokortex wird L-Glu auch in zahlreichen anderen Strukturen des Zentralnervensystem als bedeutender erregender Neurotransmitter angesehen (Fagg und Foster, 1983).

I.2. Aufgabenstellung

Der molekulare Wirkungsmechanismen von Antiepileptika mit antimanischen Wirkungen ist noch weitgehend ungeklärt. Durch die Kombination mikroelektrophoretischer bzw. pneumatischer Applikation von Substanzen aus Mikropipetten mit extrazellulären Einzelzelleableitungen, sollte die Interaktion zwischen den oben genannten Medikamenten und den Überträgerstoffen GABA und L-Glu näher charakterisiert werden. Die extrazellulären Ableitungen wurden im Neokortex der Ratte in vivo gemacht. Die Wirkung einer neuroaktiven Substanz wurde durch die Zu- oder Abnahme der spontanen oder chemisch-induzierten Entladungstätigkeit des Neurons charakterisiert. Nervenzellen, die keine spontane Aktivität zeigten, wurden durch mikroiontophoretisch appliziertes L-Glu aktiviert.

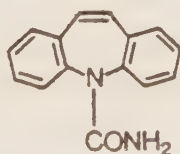
I.3. a) Die klinische Bedeutung von Carbamazepin

Carbamazepin, bekannt auch als Sirtal^R (LABAZ), Tegretal^R (GEIGY) oder als Timonil^R (DESITIN), wurde von der Firma GEIGY zu Beginn der 50er Jahre entwickelt. Seit 25 Jahren ist Carbamazepin als antikonvulsives Medikament eingeführt

(Olpe und Mitarbeiter, 1985; Theobald und Kunz, 1963). Klinische Anwendung findet Carbamazepin heute bei komplexen und fokalen psychomotorischen Anfällen und grand mal-Epilepsie. Besonders hilfreich ist Carbamazepin in der Behandlung der Trigeminusneuralgie (Cereghino und Mitarbeiter, 1974). Seit einiger Zeit wird Carbamazepin auch bei affektiven Schizophrenien und bipolaren Psychosen, sowohl als adjuvante Therapie in Kombination mit Lithium oder auch als Monotherapie angewendet (Emrich und Mitarbeiter, 1984).

Wegen seiner guten Verträglichkeit und seinen geringen Nebeneffekten ist es vor allem zur Langzeitbehandlung der genannten Epilepsieformen besonders geeignet. Neben Carbamazepin ist auch ein Metabolit (Carb-10,11-Epoxyt) antiepileptisch wirksam (Morselli und Frigerio, 1975). Carbamazepin erzielt seine therapeutische Wirkung bei einer täglichen Einnahme von 800-1200 mg.

Strukturformel:



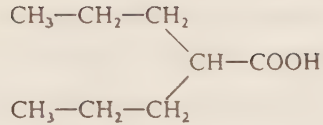
Carbamazepin

Elektrophysiologische und neurochemische Untersuchungen weisen darauf hin, daß Carbamazepin eine Abnahme der neuronalen Erregbarkeit hervorruft, ohne dabei jedoch ein Transmittersystem spezifisch zu beeinflussen (Olpe und Mitarbeiter, 1985).

I.3. b) Die klinische Bedeutung von Valproat

Valproat wurde bereits 1882 von Burton synthetisiert. Bis zum Februar 1962 hatte Valproat keine therapeutische Bedeutung. Bei der Untersuchung von Khellin-Derivaten auf ihre mögliche antikonvulsive Wirkung wurde Valproat als Lösungsmittel verwendet. Dabei entdeckte P. Eymard bei den Lösungsmittel-Kontrolluntersuchungen die antikonvulsiven Eigenschaften von Valproat. Zwei Jahre später veröffentlichte Carraz erste klinische Studien zum antikonvulsiven Wirkungsmechanismus von Valproat (Carraz und Mitarbeiter, 1964). Zunächst wurde es nur bei Patienten eingesetzt, die auf die herkömmliche antiepileptische Therapie nicht ansprachen (Pinder und Mitarbeiter, 1977; Simon und Penry, 1975). Heute wird es wegen seiner guten Wirksamkeit auch als Langzeitmedikation gegeben. Valproat ist unter dem Namen Convulex^R (PROMONTA), Ergenyl^R (LABAZ), Leptilan^R (GEIGY), Mylproin^R (ICI-Pharma) und Orferil^R (DESITIN) erhältlich. Valproat unterscheidet sich von anderen Antiepileptika durch seine aliphatische Struktur und das Fehlen eines Stickstoffatoms im Molekül.

Strukturformel:

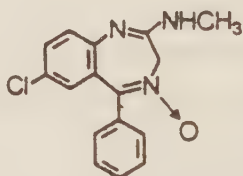


Neben seiner antikonvulsiven Wirkung ist Valproat, ähnlich wie Carbamazepin, in der Therapie von affektiven und bipolaren Psychosen, sowohl als adjunktives Medikament als auch in der Monotherapie erfolgversprechend (Emrich und Mitarbeiter, 1984). Der neuronale Wirkungsmechanismus von Valproat ist noch weitgehend ungeklärt. Erste Arbeiten über die Wirkungsweise von Valproat berichteten von einer Erhöhung des GABA-Spiegels im Gehirn infolge eines Eingriffs in den GABA-Metabolismus. Dabei wurde ein verstärkter Aufbau von GABA durch Glutaminsäure-Decarboxylase (Löscher und Frey, 1977) oder eine Hemmung der GABA-abbauenden Enzyme postuliert (Godin und Mitarbeiter, 1969; van der Laan u. a., 1979). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß zur Erzielung einer antikonvulsiven Wirkung geringere Dosierungen von Valproat ausreichen, als zu einer Erhöhung des GABA-Spiegels nötig sind (Anlezark und Mitarbeiter, 1976). Aus diesem Grunde läßt sich zwischen der antikonvulsiven Wirkung von Valproat und der Erhöhung des GABA-Spiegels im Gehirn nicht ohne weiteres ein Zusammenhang herstellen (Chapman und Mitarbeiter, 1982).

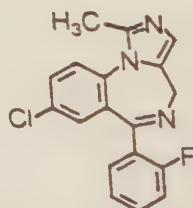
I.3. c) Klinische Bedeutung von Benzodiazepinen

Die in dieser Studie untersuchten Benzodiazepine sind Chlordiazepoxid (Librium^R, HOFFMANN-LA ROCHE) und Midazolam (Dormicum^R, HOFFMANN-LA ROCHE). Diese beiden Benzodiazepine wurden wegen ihrer Wasserlöslichkeit und der damit gegebenen Möglichkeit zur mikroiontophoretischen Applikation gewählt.

Strukturformeln:



Chlordiazepoxide



Midazolam

Im Jahre 1957 beschrieb Randall die pharmakologischen Eigenschaften von Chlordiazepoxid (Haefely und Mitarbeiter, 1985). Im Jahre 1960 fand Chlordiazepoxid als Anxiolyticum unter dem Handelsnamen Librium^R Eingang in die Therapie. Zwei Jahre später folgte Diazepam unter dem Namen Valium^R. Diese beiden Benzodiazepine und ihre Derivate, die in schneller Folge erschienen, wurden bald zu den meist verschriebenen, zentral-aktiven Medikamenten. Im Jahre 1983 standen für die Therapie über 35 Benzodiazepine zur Verfügung (Haefely und Mitarbeiter, 1985). Aufgrund unterschiedlicher Halbwertszeiten im Organismus werden "short-acting" (Halbwertszeit 2-6 Stunden), "intermediate-

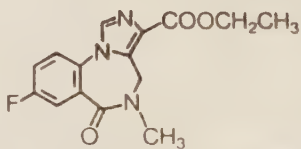
acting" (Halbwertszeit 6-25 Stunden) und "long-acting" (Halbwertszeit 24-48 Stunden) Benzodiazepine unterschieden (Breimer und Mitarbeiter, 1980). Die kurz-wirksamen Benzodiazepine werden vorwiegend zur Behandlung von Einschlafstörungen, bei akuten Angstzuständen, z.B. in der Entgiftungsphase bei alkoholabhängigen Patienten und als Prämedikation vor einer Narkose angewendet. Die länger-wirksamen Benzodiazepine werden bei Ein- und Durchschlafstörungen, zur Behandlung von Muskelverkrampfungen und bei Angstzuständen verschiedener Genese sowie bei verschiedenen Anfallsleiden eingesetzt. Da Benzodiazepine sowohl zu psychischer als auch zu physischer Abhängigkeit führen, sind sie für Langzeittherapien jedoch nur bedingt geeignet (Cohn, 1983).

Trotz einiger interessanter Ansätze zur Erklärung der Benzodiazepinwirkung (Schmidt und Mitarbeiter, 1967) blieb der neuronale Wirkungsmechanismus der Benzodiazepine bis vor wenigen Jahren ungeklärt. In elektrophysiologischen und biochemischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß Benzodiazepine ganz spezifisch an GABAergen Synapsen angreifen (Assumpcao und Mitarbeiter, 1979; Costa und Mitarbeiter, 1975; Haefely und Mitarbeiter, 1975). In Bindungsstudien an Hirngewebsschnitten wurde ein spezifischer Benzodiazepin-Rezeptor in enger Beziehung zu GABAergen Synapsen identifiziert (Bosmann und Mitarbeiter, 1977; Möhler und Okada, 1977a,b; Squires und Braestrup, 1977).

I.3. d) Die klinische Bedeutung von Ro 15-1788

Eine Veränderung am Benzodiazepin-Molekül führt zu einer Substanz, die am Benzodiazepin-Rezeptor bindet, aber alle pharmakologischen Effekte der klassischen Benzodiazepine blockiert (Hunkeler und Mitarbeiter, 1981). Im Jahre 1981 wurde die erste Untersuchung über das Imidazobenzodiazepin-nonderivat Ro 15-1788 veröffentlicht.

Strukturformel:



Ro 15-1788

Mit Benzodiazepin vorbehandelte Tiere zeigen nach intravenöser oder oraler Gabe von Ro 15-1788 nach kurzer Zeit deutliche Entzugserscheinungen (Cumin und Mitarbeiter, 1982). In Dosierungen, die ausreichen, um Benzodiazepin-Wirkungen zu antagonisieren, ist Ro 15-1788 üblicherweise ohne erkennbare Wirkungen auf die neuronale Erregbarkeit (Ziegler und Schalch, 1983). Die antagonistischen Wirkungen von Ro 15-1788 sind spezifisch für Benzodiazepine; die Effekte von Barbituraten, Probamat, Ethanol und GABA-mimetischen Substanzen werden nicht antagonisiert.

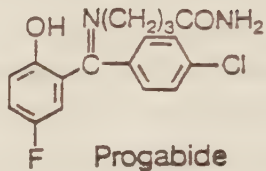
Der Nachweis spezifischer Benzodiazepin-Bindungsstellen im ZNS legt den Schluß nahe, daß im Organismus endogene Benzodiazepine existieren. Der natürliche Benzodiazepin-Ligand ist bis

heute noch unbekannt. β -Carboline, eine Substanzgruppe, die aus dem menschlichen Urin isoliert wurde, sind irrtümlicherweise für Metaboliten eines endogenen Benzodiazepin-Liganden gehalten worden (Braestrup und Nielsen, 1980). Diese Substanzen blockieren die Effekte von Benzodiazepin-Agonisten. Jedoch im Gegensatz zu Ro 15-1788 haben sie zusätzlich eine, den Benzodiazepinen entgegengesetzte Wirkung, d.h., sie wirken prokonvulsiv und anxiogen. Ein bemerkenswertes Ergebnis dieser Untersuchungen war, daß der Benzodiazepin-Antagonist Ro 15-1788 die prokonvulsive Aktivität der β -Carboline vollständig zu antagonisieren vermag. Aus diesem Grunde werden die β -Carboline auch als "inverse Benzodiazepin-Agonisten" bezeichnet (Coddington und Muir, 1985).

Naheliegende Indikationen für Ro 15-1788 sind Benzodiazepin-Intoxikationen, da dieser Antagonist den zentral dämpfenden Benzodiazepin-Effekt rasch und vollständig blockiert. Klinische Untersuchungen in der Anaesthesiologie zeigen, daß Patienten, die präoperativ mit Benzodiazepinen behandelt wurden, nach Applikation von Ro 15-1788 wacher wirkten und eine Verbesserung der Gedächtnisleistung und der Orientierung aufwiesen (Doenicke und Mitarbeiter, 1984; Emrich, 1986).

I.3. e) Die klinische Bedeutung von Progabide

Strukturformel:



Nach dem heutigen Wissensstand ist Progabide ein GABA-Rezeptoragonist. Seine klinische Bedeutung ist noch nicht gesichert. Folgende mögliche Indikationsstellungen sind in der klinischen Erprobung: verschiedene Formen depressiver Erkrankungen, zerebrale Anfallsleiden, zentral bedingte Erhöhung des Skelettmuskeltonus, hyperkinetische Bewegungsstörung nach Gabe von Neuroleptika, Schizophrenie, bipolare Psychosen und Morbus Parkinson.

Es wurde postuliert, daß unter normalen physiologischen Bedingungen Progabide keine erkennbaren zentralen Wirkungen besitzt. Erst unter Bedingungen, in denen ein verändertes Neurotransmittergleichgewicht die Ursache für pathologische Zustände ist, scheint Progabide therapeutisch wirksam zu werden (Bartholini und Mitarbeiter, 1985). Folgende Befunde stützen diese Hypothese: a) der muskelrelaxierende Effekt von Progabide ist unter normotonen Bedingungen nicht sichtbar, tritt aber bei Krankheiten, die mit einer Muskeltonuserhöhung einhergehen, in Erscheinung; b) Progabide zeigt eine Stimmungsaufhellung bei depressiven Personen, verändert die Stimmungslage aber bei

Gesunden nicht; c) bei Patienten, die durch Neuroleptika ausgelöste hyperkinetische Bewegungsstörungen haben, bessert Progabide diese unerwünschten Nebenwirkungen. Bei gesunden Personen hat Progabide keinen Einfluß auf Bewegungsabläufe.

Dieser ungewöhnlich selektive Effekt auf pathologisch veränderte neuronale Prozesse wäre eine ideale Voraussetzung für ein zentralwirksames Medikament. Er bedarf aber noch einer weiteren experimentellen Sicherung (Einzelheiten dazu siehe Bartholini und Mitarbeiter, 1985). Bei der Behandlung der Epilepsie zeigte Progabide bisher keine therapeutische Überlegenheit gegenüber eingeführten Anticonvulsiva wie z.B. Carbamazepin (Schmidt, 1985) und Valproat (Bossi und Mitarbeiter, 1985).

II. METHODE

II.1 Tierpräparation

Für die Untersuchungen wurden männliche Albino-Ratten (Körpergewicht 160-220 g) verwendet. Die Narkose wurde mit einem Mund-Nasen-Tubus und einer hohen Halothan-Dosis (4.0 vol%) aus einem Gasverdampfer (Vapor 19, Fa. Dräger) eingeleitet. Die Tiere atmeten ein Halothan-Carbogen-Gemisch. Bereits nach wenigen Minuten erreichte das Tier Narkosestadium III. Die Narkosetiefe war durch Überprüfung der Atemfrequenz, des Lidschlußreflexes und Nachlassen des Skelettmuskeltonus kontrollierbar. Anschließend wurde das Tier tracheotomiert und atmete spontan das Halothan-Carbogengemisch aus einem doppelwandigen Tubus aus Plastikrohr. Die abgeatmete Luft und das überschüssige Halothan-Carbogengemisch wurden abgesaugt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose benötigte das Tier eine Halothan-Dosis von 0,8-1,2 vol%. Die Körpertemperatur des Tieres wurde mittels eines Thermo-Fühlers rektal kontinuierlich gemessen und mit einem Heizkissen und einer Wärmelampe im Bereich zwischen 37-38°C gehalten.

Präparation des Kortex: Im Anschluß an die Tracheotomie wurde das Tier mit Ohrstiften und Kieferhalterung in einem stereotaktischen Ableitrahmen befestigt, der sich auf einem schwingungsgedämpften Ableittisch befand. Nach Ablösung des Felles und der Muskelschichten über dem vorderen Kopfbereich, wurde das Periost vom Schädelknochen entfernt. Auf den freiparierten Knochen wurde Knochenwachs (ETHICON) dünn aufgetragen.

Unter einem Operationsmikroskop wurde der Schädelknochen mit einer elektrischen Handfräse trepaniert. Die letzte Knochenschicht (Lamina vitrea) wurde mit der Spitze einer feinen Injektionskanüle geöffnet und dann mit feinen Uhrmacher-Pinzetten abgehoben. Mit der Spitze der feinen Injektionsnadel wurde die Dura mater und Arachnoidea inzidiert. Einige Tropfen körperl warmer Paraffinlösung deckten das Operationsgebiet ab, um den darunterliegenden Kortex vor Austrocknung und Auskühlung zu bewahren. Der Ableitungsort wurde mittels stereotaktischer Koordinaten nach König und Klippel (König und Klippel, 1963) bestimmt (Abb. II.1).

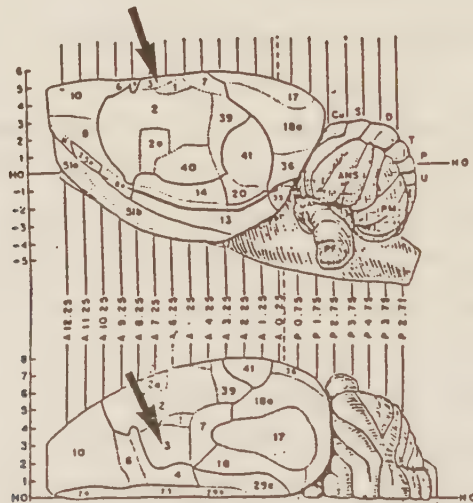


Abb. II.1 Die Abbildung zeigt die Verteilung der Brodmann Area im Kortex der Ratte. Die schwarzen Pfeile markieren das Areal, aus dem die Neurone abgeleitet wurden.

Die Neurone wurden in einer Tiefe von 0,2-1,8 mm abgeleitet. Das entspricht den Großhirnrindenschichten III-V nach Rockel (1980) (Abb. II.2).

II.2. Cytoarchitektur des Kortex

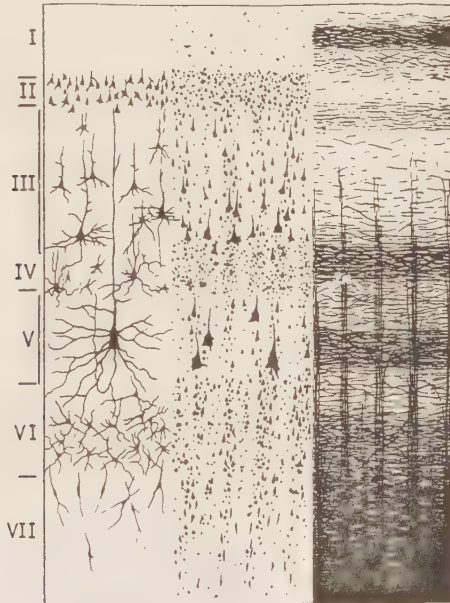


Abb. II.2 Kortexschichten I-VII (Mensch); a) Silberimprägnation nach Golgi; b) Darstellung der Nervenzellkörper nach Nissl; c) Faserfärbung nach Weigert (aus Creutzfeldt, 1983).

Mit verschiedenen Präparatfärbungen (Färbung der Zellkörper nach Nissl, Silberimprägnation nach Golgi, Markscheidenfärbung nach Weigert) ergeben sich sieben Schichten, die von außen nach

innen als Schicht I-VII bezeichnet werden (Creutzfeldt, 1983; Economo, 1927; Kahle und Mitarbeiter, 1979; Schmidt und Thews, 1980). In den oberflächlichen Schichten (I und II) findet man vorwiegend Axone und Dendriten, in den tieferliegenden Schichten (III und V) vorwiegend Pyramidenzellen. Pyramidenzellen sind zwischen 12 und 45 μm hoch und an ihrer Basis zwischen 10 und 20 μm breit. Pyramidenzellen mit bis zu 120 μm Höhe und 80 μm Breite nennt man auch nach ihrem Entdecker Betz'sche Riesenzellen. Schicht IV enthält überwiegend kleine Neurone und Fasern und nur wenige Pyramidenzellen (Creutzfeldt, 1983; Economo, 1927; Schmidt und Thews, 1980). Eine weitere Gruppe kortikaler Neurone sind die Körnerzellen. Diese findet man vorwiegend in Lamina II und IV (Economo, 1927). Ihr Soma ist zwischen 4 und 8 μm hoch und 4-10 μm breit. Folgende Abbildung zeigt einen Vergleich der relativen Kortexschichtendicke der Brodmann Area 4 bei Maus, Ratte, Katze, Makake und Mensch (Rockel und Mitarbeiter, 1980) (Abb. II.3).

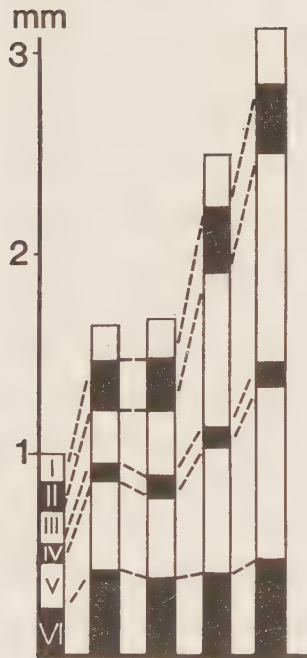


Abb. II.3 Das Diagramm vergleicht die Schichtendicken des Kortex von Maus, Ratte, Katze, Makake und Mensch (Rockel und Mitarbeiter, 1980).

II.3. Mikroiontophorese

Mikroiontophorese und Mikroelektrophorese sind synonym. Der Ausdruck "Elektrophorese" wurde ursprünglich in der physikalischen Chemie benutzt, um die Bewegung geladener Moleküle im elektrischen Feld zu beschreiben. Mit den Arbeiten von Nastuk (1953) und der Weiterentwicklung der Mikroelektrodenteknologie durch Del Castillo und Katz (1955) begann die Anwendung der Iontophorese von Substanzen aus Mikropipetten in der neurophysiologischen und neuropharmakologischen Forschung (Stone, 1985).

Durch die Kombination extrazellulärer oder intrazellulärer Ableitungstechnik mit extrazellulärer Mikroiontophorese ist es möglich, chemische Substanzen simultan oder nacheinander (z.B. fragliche Überträgerstoffe, Antagonisten oder ein Medikament) selektiv und in kleinen Mengen in die Nähe einer Nervenzelle zu applizieren (Purves, 1981).

Vorteile der Substanzapplikation durch Mikroiontophorese:

- Substanz kann reproduzierbar appliziert werden;
- Substanzkonzentration ist proportional zum Stromfluß;
- die Substanzen können unter Umgehung der Blut-Gehirnschranke appliziert werden;
- die Substanzwirkung auf einzelne Neurone in vivo kann ohne Beeinflussung von Blutdruck, Atmung oder anderer Strukturen des Nervensystems untersucht werden.

Die Anwendung dieser Technik führte zu einer explosionsartigen Entwicklung in der Neurobiologie. Die Möglichkeit, die Wirkung eines möglichen Überträgerstoffes in vivo nachzuahmen,

erlaubte erstmals die systematische Untersuchung von agonistisch und antagonistisch wirkenden Substanzen auf zellulärer Ebene und so die Aufklärung und Klassifizierung physiologischer und pharmakologischer Wirkungen an Synapsen. Eccles (1957, 1964) zeigte mit dieser Technik, daß mit Hemmung und Erregung an Synapsen charakteristische Veränderungen transmembranöser Ionenströme auftreten.

II.3. a) Prinzip der Mikroiontophorese

Unter Elektrophorese versteht man die durch ein angelegtes elektrisches Feld verursachte Bewegung von gelöstem oder suspendiertem Material (Steiner, 1971). Die Elektrophorese ist eines der vier elektrokinetischen Phänomene (Elektroosmose, Strömungspotential, Sedimentationspotential), die bei der relativen Bewegung zwischen festen und mobilen Teilen einer elektrischen Doppelschicht auftreten (Adamson, 1960; Curtis, 1964; Davies und Rideal, 1961; Shaw, 1969). Von den vier elektrokinetischen Phänomenen ist in dieser Arbeit nur die Elektrophorese, bzw. Iontophorese und die Elektroosmose von Bedeutung.

Bei der Mikroiontophorese fließt ein Gleichstrom durch eine Mikropipette (siehe II.5), dessen Polarität sich nach der auszu-treibenden Ionenart richtet. Wird an eine mit einer ionisierten Substanzlösung gefüllte Pipette eine positive Spannung angelegt, so transportiert der nun fließende Strom beispielsweise Kationen aus der Spitze der Mikropipette heraus (siehe dazu Abb. II.4).

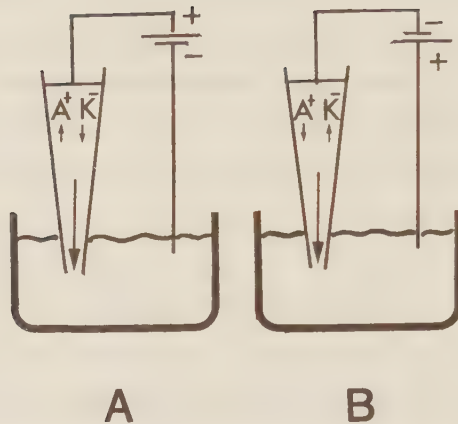


Abb. II.4 Schema der Elektrophorese. Entsprechend der Polarität des angelegten Gleichstromes werden A) die Kationen (K^-) oder B) die Anionen (A^+) aus der Mikropipettenspitze freigesetzt (Steiner, 1971).

Voraussetzung für die Materialbewegung im elektrischen Feld ist die Oberflächenladung der Substanzen, die entweder durch Ionisation, Ionendissolution oder Ionenabsorption aufgebaut werden (Shaw, 1969). Bei den meisten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen spielt die Ionisation die Hauptrolle. Beispielsweise werden bei Aminosäuren (L-Glu, GABA) durch Einstellen eines bestimmten pH-Wertes entweder die Carboxylgruppe oder die Aminogruppe ionisiert. Eine Aminosäure wird bei

niedrigem pH-Wert positiv und bei einem hohen pH-Wert negativ geladen sein.

Unerwünschte Effekte bei der Anwendung der Mikroiontophorese sind die Diffusion der Substanzlösung aus der Pipettenspitze und Substanzaustritt durch den hydrostatischen Druck der Substanzlösung. Um das unkontrollierte Herauswandern aktiver Ionen durch Diffusion und hydrostatischen Druck zu verhindern, wird im applikationsfreien Intervall ein Gegenstrom an die Pipette angelegt (Curtis, 1964). Da anionische Phoreseströme häufig Neurone erregen und kationische Ströme Neurone hemmen, müssen bei der Substanzapplikation Stromartefakte durch automatische Stromkompensation ausgeschlossen werden. In jeder Mehrfachelektrode wird deshalb ein Röhrchen mit Kochsalzlösung (3.0 M) gefüllt und ein zur Substanzapplikation entgegengepolder Strom angelegt und so der Stromfluß an den Mikropipettenspitzen neutralisiert (Zieglgänsberger und Puil, 1973).

II.3. b) Quantitative Aspekte der Mikroiontophorese

In einer Lösung mit einer ionisierten Substanz ist der Ionenstrom der Strommenge proportional. Bei vollständig ionisierten Lösungen läßt sich die Zahl der aus einer Mikropipette freigesetzten Ionenmenge durch das II. Faraday'sche Gesetz beschreiben:

$$M_i = (T_n \cdot i) / (z \cdot F) \quad (\text{Mol/sec})$$

(M_1 = Ionenstrom (Mol/sec); T_n = Transportzahl; i = applizierter Strom (nA); F = Faraday Konstante; z = Wertigkeit des Ions)

Unter Versuchsbedingungen in vivo spielen folgende Störfaktoren eine Rolle und führen üblicherweise zu einer Verringerung der Freisetzung: 1. fixierte Ladungen an der Kapillarwand; 2. Veränderung der Mobilität der Ionen durch Hydratationshüllen und 3. die Ausbildung semipermeabler Membranen durch Gewebspartikel oder Substanzkristalle an der Pipettenspitze. Die aus einer Mikropipettenspitze freigesetzte Substanzmenge ist dem elektrischen Strom proportional, entspricht aber nur selten den (s.o.) errechneten Werten (Curtis, 1964; Krnjevic und Phillis, 1963; Zieglgänsberger und Mitarbeiter, 1969). Eine genauere Methode, die Transportzahl von Ionen aus der Mikroelektrodenpitze zu messen, ist die Anwendung radioaktiv geladener Substanzen (Armstrong und Mitarbeiter, 1981; Bradshaw und Mitarbeiter, 1981; Herz und Mitarbeiter, 1969; Kruk und Mitarbeiter, 1980; Zieglgänsberger und Mitarbeiter, 1974). Übereinstimmend zeigen diese Untersuchungen, daß bei der Mikroiontophorese die Menge der aus Mikropipetten freigesetzten Substanz, sowohl von der Konzentration in der Pipette als auch von der auszutreibenden Stromstärke abhängt.

II.3. c) Die technische Realisation der Mikroiontophorese

Wir verwendeten ein Mikroiontophoresegerät der Firma Medical System Corporation. Das Gerät besteht aus 4 Phorese-

kanälen und einem Kanal für pneumatische Applikation von Substanzen aus Mikropipetten. Jeder Phoresekanal kann durch verschiedene externe Signale angesteuert werden. Die Applikationszeit und das Intervall (Bereich: 1-99 sec) zwischen den Applikationen wurde durch interne Zeitgeber kontrolliert. Während des applikationsfreien Intervalls schaltete das Gerät automatisch auf Rückhaltestrom (s.u.). Die Iontophoresestromstärke war für beide Polaritäten in einem Bereich zwischen 0-500 nA regelbar. Für jeden Phoresekanal ließ sich der Rückhaltestrom für beide Polaritäten in einem Bereich zwischen 0-50 nA einstellen. Um die spontane Freisetzung von aktiven Substanzen aus den Mikropipetten zu verhindern, wurde in den vorliegenden Versuchen an jeden Kanal ein Rückhaltestrom entsprechender Polarität (5-10 nA) angelegt. Da aus früheren Untersuchungen bekannt war, daß dieser Rückhaltestrom eine Verminderung der Konzentration der Wirksubstanz in der Pipettenspitze hervorruft, war es notwendig, vor Beginn der eigentlichen Messung die Iontophorespipetten durch mehrmaliges kurzes Applizieren der Substanz in einem festen Zyklus "aufzuwärmen". Dieser Applikationszyklus wurde dann während der Untersuchungen nicht verändert.

Das Iontophoresegerät kompensierte automatisch den Iontophoresestrom (und die gleichzeitig anliegenden Rückhalteströme) durch Injektion des entsprechenden Gegenstromes über den NaCl-Kanal (siehe auch II.3. b)). Nicht kompensierter Phoresestrom wurde am Gerät angezeigt. War dieser Wert größer als 2-3 nA, dann wurde das Experiment bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Der elektrische Widerstand der Iontophoresepipetten konnte während des Experiments gemessen werden. Für die pneumatische

Applikation (II.4.) wurde Druckluft im Bereich von 1-70 kPa verwendet. (Technische Einzelheiten des verwendeten Mikroiontophoresegeräts siehe Stone, 1985.)

II.3. d) Prinzip der Elektroosmose

Bei der Elektroosmose bewegt sich eine Flüssigkeit relativ zu einer geladenen Oberfläche (z.B. Glaswand einer Mikropipette). Dies entspricht dem Komplement der Elektrophorese (Adamson, 1960; Curtis, 1964; Davies and Rideal, 1961; Shaw, 1969; Stone, 1985). Dieser Vorgang macht es möglich, auch Substanzen zu applizieren, die nicht durch Ionisation, Ionendissolution oder Ionenabsorption eine Oberflächenladung haben. Da die Glaswand der Mikropipette gegenüber der Flüssigkeit negativ geladen ist, verschiebt sich bei Anlegen eines negativen Stromes die Flüssigkeitssäule in Richtung Mikropipettenspitze.

II.3. e) Quantitative Aspekte der Elektroosmose

Wie bereits erwähnt, wird die Elektroosmose verstanden als relative Bewegung einer Flüssigkeit zu einer stationär geladenen Oberfläche (z.B. Kapillarwand). Sie ist von verschiedenen Faktoren abhängig, nämlich dem Zetapotential (kinetisches Potential), dem Potential, das sich zwischen Kapillarwand und Lösung aufbaut, von Konzentration und Viskosität der Lösung sowie vom Spitzendurchmesser der Kapillare. Nach Adamson (1960) läßt sich der elektroosmotische Flüssigkeitsstrom folgendermaßen beschreiben.

$$V = (\zeta \cdot r^2 \cdot \epsilon \cdot E) / (4 \cdot \eta \cdot l \cdot 300^{-2})$$

V = Volumen in ml/sec einer durch ein Rohr transportierten Flüssigkeit

ζ = Potential zwischen Kapillarwand und Flüssigkeit

r = Radius des Rohres

l = Länge des Rohres

ϵ = Die Elektrizitätskonstante des Lösungsmittels

E = angelegtes Potential

η = Viskositätskoeffizient der Lösung

300^{-2} = Umrechnungsfaktor von elektrostatischen Einheiten auf Volt

Wenn man u für die elektroosmotische Mobilität einsetzt, erhält man vereinfacht

$$V = (\pi \cdot r^2 \cdot u \cdot E) / (l) \quad \text{ml/sec}$$

$$u = \text{cm/Volt} \cdot \text{sec}$$

Betrachtet man die Elektrodenspitze als Zylinder, dann erhält man

$$V = u \cdot i \cdot \zeta \quad (\text{ml/sec})$$

ζ = spezifischer Widerstand der Lösung

i = Strommenge

Daraus folgt für den elektroosmotischen Flüssigkeitsstrom

$$M_{\text{Osm}} = u \cdot i \cdot c \cdot 10^{-3} \text{ (Mol/sec)}$$

Die Freisetzungsrates einer Substanz setzt sich also aus elektrophoretischem Strom und elektroosmotischen Anteilen zusammen. Die Elektroosmose bestimmt die Freisetzungsrates, wenn wenig oder nicht ionisierbare Lösungen freigesetzt werden sollen.

II.4. Pneumatische Applikation (Mikrosuperfusion)

Anfänglich wurde die pneumatische Applikation zur Freisetzung von pharmakologisch wirksamen Substanzen aus Mikropipetten benutzt, um elektrische Stromartefakte auf die Nervenzelle auszuschließen (Krnjevic und Phillis, 1963). Heute wird die pneumatische Applikation meist bei Substanzen verwendet, die 1.) nicht ionisierbar oder 2.) nur in geringen Konzentrationen in einem adäquaten Lösungsmittel lösbar sind (Palmer, 1982).

In der vorliegenden Arbeit wurde die pneumatische Applikation verdünnter Lösungen (10^{-4} - 10^{-6} M) angewandt. Diese Methode ermöglicht ein Eingrenzen der Effektivkonzentrationen, da die Gewebkonzentration der Substanz nie höher als die in der Pipette vorhandene Konzentration sein kann. Daher ermöglicht diese, im folgenden als Mikrosuperfusion bezeichnete Applikationsmethode die Messung von Dosis-Wirkungsbeziehungen in einer in vivo-Präparation. Bei der Mikrosuperfusion werden verdünnte Lösungen

mit sehr niedrigen Drucken ins Gewebe freigesetzt. Eine Kontrolle des Volumens spielt dabei also keine Rolle. Zum Ausschluß von Druckartefakten auf die neuronale Antwort wurden entsprechende Drucke auf eine mit 0.9% Kochsalzlösung gefüllte Pipette appliziert.

II.4. a) Quantitative Aspekte

Die Freisetzungsrates einer Substanz aus einer Mikropipette kann elektrochemisch oder mittels radioaktiver Tracermethoden gemessen werden. Die durch Druckapplikation erzielte Freisetzungsrates ist eine lineare Funktion des angelegten Druckes und der Applikationszeit (Stone, 1985). Die freigesetzten Volumina bei einem Elektrodenspitzendurchmesser von 1 μm erreichen 0,5 femtoliter bis 1,5 nanoliter/sec bei Druckstärken im Bereich von 30-100 kPa (siehe auch Stone, 1985). Eine Vergrößerung des Spitzendurchmessers um 0,3 μm führen bei gleichbleibendem Druck zu einer 10fachen Erhöhung des freigesetzten Flüssigkeitsvolumens. Die Spontanfreisetzung von Lösungen durch Diffusion und hydrostatischen Druck aus der Pipettenspitze kann nicht verhindert werden. Deshalb ist es wichtig, bei hochwirksamen Substanzen nur verdünnte Lösungen zu verwenden und die Applikationspipette versetzt zur Ableitungselektrode zu arrangieren. Bei der hier angewandten Mikrosuperfusion konnte die erreichte Konzentration im Gewebe nie höher sein, als die Konzentration der Substanz in der Mikropipette (siehe auch unten).

II.4. b) Die technische Realisation der Mikrosuperfusion

Die Mikropipette wurde mit einem Spezialschlauch an eine extern und intern steuerbare Druckluftquelle angeschlossen. Zunächst wurde mit geringem Druck (5-10 kPa) über einen längeren Zeitraum (1-3 min) Substanz aus der Mikropipette ins Gewebe freigesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich die Amplitude des Aktionspotentials als Ausdruck eines möglichen Druckartefaktes nicht veränderte. Anschließend wurde der Druck langsam bis auf maximal (0.3-1.0 min) 30 kPa erhöht. Die Applikationszeit betrug bis zu 15 Minuten.

II.5. Herstellung der Mikropipetten

Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden zur Substanzapplikation Mehrfachpipetten mit fünf Kanälen verwendet. Bei systemischer Substanzapplikation wurde meist mit Einzelelektroden abgeleitet.

Das Grundmaterial der Mehrfachpipetten und Ableitungselektroden bestand aus Borosilikatglaskapillaren mit Filament. Die durch das Filament verursachte Kapillarkraft bewirkt eine luftblasenfreie Füllung der Pipettenspitze. Die Glaskapillare wurde in einem horizontalen Elektrodenziehgerät (Puller-Steuergerät, Eigenbau) ausgezogen. Bei diesem Vorgang wurde die Glaskapillare durch eine elektrisch aufgeheizte Glühwendel erwärmt und anschließend mit einem elektronisch gesteuerten Magneten

auseinandergezogen. Durch Veränderung der Temperatur und Magnetzugstärke konnte die Länge der Pipettenspitze variiert werden. Die Spitze der Ableitelektrode wurde anschließend unter einem Mikroskop (400fache Vergrößerung) auf $1\text{ }\mu\text{m}$ gebrochen. Anschließend wurde der Elektrodenschaft erhitzt und mit einer Glühwendel um $30\text{--}50^\circ$ gebogen. Die Ableitelektrode wurde mit einer NaCl-Lösung (3,0 M) gefüllt. Der anschließend eingeschobene chlorierte Silberdraht (AgCl , eigentliche Ableitelektrode) wurde mit dem Verstärker verbunden. Der Widerstand der Ableitungselektroden lag zwischen 5-15 MQ (Einzelheiten siehe auch Curtis, 1964; Stone, 1985; Thompson and Patterson, 1974).

II.5. a) Herstellung der Mehrfachpipetten

Fünf Glaskapillaren wurden zur Montage einer Mehrfachpipette gestaffelt angeordnet. Zwei Metallringe wurden über die Glaskapillaren gezogen und mit einem Zwei-Komponenten-Kleber ("UHU plus") verklebt (Abb. II.5A). Um eine konzentrische Ausrichtung der Glaskapillaren zu erreichen, wurden sie auf eine genutete Grundplatte gelegt (Abb. II.5B). Das Aushärten des Zwei-Komponenten-Klebers wurde beschleunigt, indem die Glaskapillaren auf der Grundplatte liegend 30 Minuten in einen auf 100°C vorgewärmten Ofen gelegt wurden. Aus den Glaskapillaren wurde dann in zwei Schritten die Mikropipette gezogen.

1. Der Mittelteil der Glaskapillaren wurde durch eine Heizspirale eines vertikalen Elektrodenziehgeräts bis zum Schmelzpunkt der Glasröhrchen aufgeheizt. Der untere Teil der Mikropipette wurde dann um $90\text{--}180^\circ$ verdreht (Abb. II.5C).

2. Nach dem Abkühlen (1 min) auf Raumtemperatur wurde die Glühwendel wieder aufgeheizt und die Mikropipette gezogen. Durch Veränderung des Magnetzugs des Elektrodenziehgeräts und der Temperatur der Glühwendel konnte die Form der Mikropipettenspitzen beeinflusst werden. Bei diesem Herstellungsverfahren entstehen immer zwei identische Mikropipetten (Abb. II.5D). Unter einem Mikroskop wurde die Spitze der Mehrfachpipette auf 5-7 μm gebrochen. Die Mehrfachpipette wurde mit der an der Spitze gebogenen Ableitelektrode zusammengeklebt, so daß die Ableitelektrode die Mehrfachpipette um 70-120 μm überragte (Abb. II.5E).

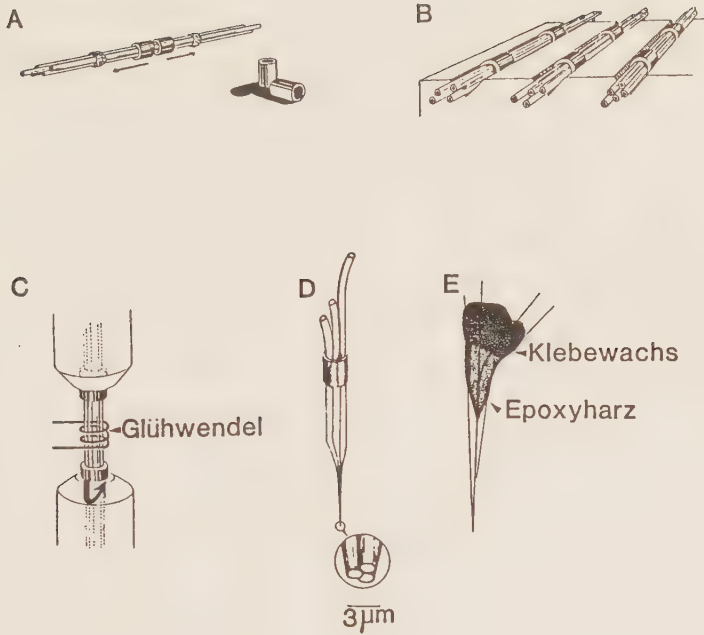


Abb. II.5 Herstellung der Mehrfachpipetten. A) Glaskapillaren und Metallringe, B) Anordnung der Glaskapillaren auf der Grundplatte, C) Pipettenrohling mit Heizspirale (der Pfeil gibt die Drehrichtung an), D) gezogene Mehrfachpipette (jeweils zwei Stück aus C)) mit der Pipettenspitze in stark vergrößertem Maßstab und E) die Mehrfachpipette mit der angeklebten Ableitelektrode.

II.5. b) Füllen der Mikropipetten

Mittels einer dünnen Kanüle wurden die Substanzlösungen in die einzelnen Kapillaren der Mehrfachpipetten injiziert, und zu etwa 2/3 gefüllt. Das Filament sorgte für eine luftblasenfreie Füllung der Pipette bis zur Spitze. Anschließend wurde ein chlorierter Silberdraht in die Pipette eingeführt. Die obere Öffnung der Mikropipette wurde mit Silikonkleber geschlossen, um eventuelle elektrische Koppelungseffekte durch Salzbrücken zu vermeiden. Außerdem wurden so die Konzentrationsveränderungen der Substanzlösungen durch Verdunstung des Lösungsmittels verhindert. Jede Mikropipette enthielt in zwei Glaskapillaren die zu untersuchende Substanz in verschiedenen Konzentrationen; in einer Kapillare eine NaCl-Lösung (3,0 M) zur Kompensation der Phoreseströme und in den beiden verbleibenden Glaskapillaren GABA (1,0 M; pH 4,5) und L-Glu (1,0 M; pH 8) (siehe unten).

II.5. c) Verwendete Substanzlösungen

Die Ableitelektrode wurde mit einer Natriumchloridlösung gefüllt (3.0 M).

Folgende Substanzen wurden aus den Mehrfachpipetten appliziert:

- Gamma-Aminobuttersäure (GABA) 1,0 M (pH 4,5);
- Mono-Na-L-glutamat (L-Glu) 1,0 M (pH 8,0);
- Carbamazepin (CBZ) 10^{-3} M, 10^{-2} M, gelöst in 10%igem Alkohol(Gew.%) oder 25%iger DMSO-Lösung (pH 7,2);

- Valproat (VAP) 10^{-6} M- $1,0$ M Lösung, gelöst in 0,9% NaCl
(pH 7,2);
- Progabide (PGB) 10^{-5} M- 10^{-3} M, gelöst in 0,9% NaCl
(pH 7,2);
- Midazolam (Mz) 10^{-5} M, 10^{-4} M, gelöst in 0,9% NaCl
(pH 7,2);
- Chlordiazepoxid (Cdpx) 10^{-3} M, gelöst in 0,9% NaCl
(pH 3,5);
- Ro 15-1788 10^{-5} - 10^{-4} M, gelöst in 0,9% NaCl (pH 7,2).

II.5. d) Kontrolle der Mikropipetten

Die Mikropipetten wurden vor Gebrauch optisch unter dem Mikroskop geprüft. Bei offensichtlichen Verunreinigungen der Mikropipettenspitze, Kristallbildungen und Luftblasen in der Pipette wurden sie nicht verwendet. Die elektrische Widerstandsmessung (Gleichstrom) diente zur weiteren Überprüfung des Zustandes der Mikropipette. Die dabei tolerierten Werte für die Ableitelektrode lagen zwischen 5-15 M und für die Mehrfachpipetten zwischen 20-50 M.

II.6. Aufbau des Meßstandes

Der Ableittisch bestehend aus einer Granitplatte, zur Schwingungsdämpfung auf Druckluftpolstern gelagert, ist durch einen Faraday'schen Käfig abgeschirmt. Der stereotaktische Rahmen, auf dem das Versuchstier fixiert wurde, stand auf dem

Ableittisch. Integriert in den stereotaktischen Rahmen war ein Heizkissen zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur des Versuchstieres und ein Stativ für den Mikromanipulator. Die Elektroden wurden mit Hilfe dieses Mikromanipulators von Hand in den Kortex eingeführt. Das Tier war über den stereotaktischen Rahmen geerdet.

Der Widerstand der zellulären Ableitungselektroden und der Spannungsabfall über den Volumenleiter bedingen, daß die Aktionspotentiale der Nervenzelle verstärkt werden müssen. Dazu diente ein Elektrometerverstärker mit Feldeffekttransistoreingang (WPI-M701). Mikroelektroden besitzen nicht nur einen Ohm'schen Widerstand, sondern infolge der Kapazität des dünneren Teiles der Glasmikroelektrode unterhalb des Schaftes auch einen Wechselstromwiderstand, der zu erheblichen Signalverzerrungen führen kann. Dieser kapazitive Verlust wurde durch eine rückgekoppelte Kapazitätskompensation im Verstärkereingang nahezu vollständig korrigiert. Die extrazellulär registrierten Aktionspotentiale wurden auf dem Bildschirm eines 2-Strahl-Oszilloskops (Dual Beam 5000, Tektronix) als tri-phasische Spannungsänderung wiedergegeben. Über einen Audioverstärker wurden die Meßsignale hörbar gemacht. Die Entladungsaktivität der Neurone wurde mittels eines Impulzzählers (Integrationszeit: 1/sec) elektronisch gezählt. Durch eine entsprechende Schaltung (z-Achsenmodulation) war auf dem Bildschirm des Oszilloskops die Diskriminierung der Aktionspotentiale optisch kontrollierbar. Ein elektromechanischer YT-Schreiber registrierte die Entladungsrate, die verwendeten Phoresestromstärken und die pneumatischen Parameter für die Mikrosuperfusion. Die Meßdaten wurden zusätzlich auf Tonband

aufgezeichnet und später ausgewertet. Außerdem bestand die Möglichkeit, Photographien direkt vom Bildschirm des Oszilloskops zu machen (siehe Abb.III.2. und III.6.).

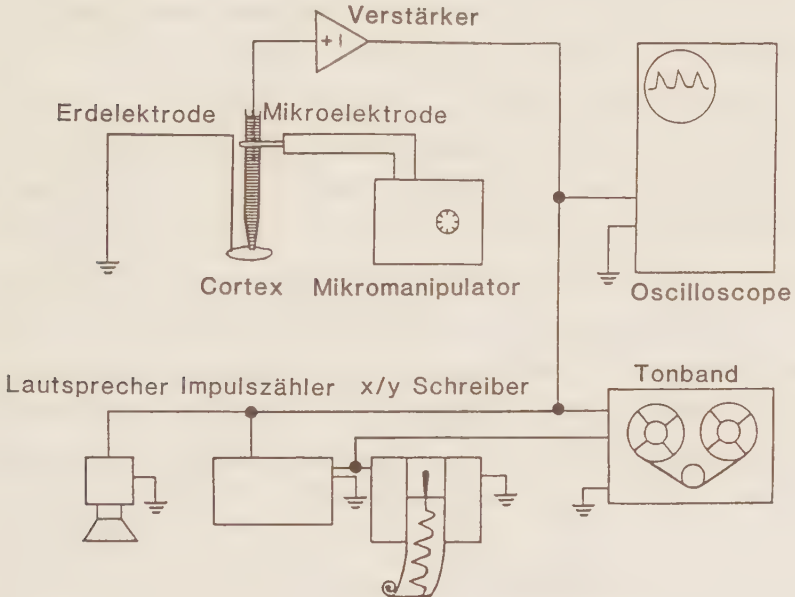


Abb. II.6 Schaltschema des Meßstandes zur extrazellulären Ableitung neuronaler Aktivität

II.7. Aufzeichnung und Analyse der Daten

Die Größe und Dauer des Aktionspotentials geben ein Maß für die Entfernung der Elektrodenspitze von der Zellmembran. Wenn die Ableitelektrode die Zellmembran verletzt, vergrößert sich die Spikedauer von ihrem normalen Wert 0,5-1 ms auf 2-5 ms.

Außerdem verkleinert sich dann die Amplitude des Aktionspotentials oder verschwindet ganz. Bei augenscheinlichen Veränderungen der Form des Aktionspotentials während der Testung der Substanzwirkung wurden die Ergebnisse verworfen. Gelegentlich wurde von mehreren benachbart liegenden Neuronen gleichzeitig abgeleitet. Aufgrund der unterschiedlichen Amplitude ihres Aktionspotentials konnten sie unterschieden werden. In die Datenanalyse wurden jeweils nur die Aktionspotentiale mit der höchsten Amplitude aufgenommen. Änderungen der Amplitude des Aktionspotentials können einen indirekten Hinweis auf eine Änderung des Ruhepotentials geben. Beispielsweise tritt während der iontophoretischen Applikation von GABA häufig eine Vergrößerung der Amplitude der Aktionspotentiale auf. Da aus anderen Untersuchungen bekannt ist, daß GABA die Zellmembran hyperpolarisiert, ist anzunehmen, daß die beobachtete Vergrößerung der Amplituden des extrazellulär abgeleiteten Aktionspotentials auf einer Hyperpolarisation beruht (Stone, 1985). Bei iontophorerischer Applikation von L-Glu verkleinerte sich die Amplitude der Aktionspotentiale bei Zunahme der Entladungstätigkeit des Neurons. Hohe Iontophoreseströme für L-Glu führten üblicherweise nach einer Verstärkung der Entladungsaktivität und gleichzeitigen Verkleinerung der Aktionspotentiale zu einem Depolarisationsblock (vorübergehende Unerregbarkeit der Nervenzelle). Häufig führte eine Erhöhung der Halothan-Dosis zu einer Verkleinerung der Amplitude der Aktionspotentiale, ohne aber gleichzeitig deren Frequenz zu verändern.

Die Amplituden der Aktionspotentiale betrugen 0,4-2,5 mV. Das Elektrodenrauschen, bedingt durch den elektrischen Widerstand der Elektrode, betrug 0,1 mV. Um die Aktionspotentiale verlässlich elektronisch zählen zu können, ist es notwendig, ein Signal/Rausch-Verhältnis von mindestens 4:1 zu haben.

Die iontophoretische Applikation einer zu untersuchenden Substanz auf spontanaktive oder auf durch L-Glu-aktivierte Neurone wurde als effektiv betrachtet, wenn sich die Entladungstätigkeit um mehr als 50% änderte und nach Beendigung der Applikation wieder auf ihren Ausgangswert zurückkehrte (+20%). Der Effekt einer iontophoretisch applizierten Substanz wurde üblicherweise nach einer Latenzzeit von 30 Sekunden - 3 Minuten sichtbar und war innerhalb eines vergleichbaren Zeitraums reversibel. Die Latenzzeit für iontophoretisch appliziertes GABA und L-Glu betrug zwischen 1-3 Sekunden. Iontophoretisch oder pneumatisch appliziert, zeigten die Substanzen bezüglich der Latenzzeit keine markanten Unterschiede.

Nur Neurone, die auf mikroiontophoretisch appliziertes L-Glu mit einer Erregungssteigerung und auf mikroiontophoretisch appliziertes GABA mit einer Erregungsverminderung reagierten, wurden in diese Arbeit einbezogen. Die durch L-Glu hervorgerufene Aktivität der Neurone betrug zwischen 10-100 Entladungen/sec und für die spontanaktiven Neurone 10-60 Entladungen/sec. Neurone unter 10 Entladungen/sec wurden registriert, später aber nicht in die Analyse mit einbezogen, da ihre Aktivität meist sehr inkonstant war.

Um eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung zeigen zu können, wurde die zu untersuchende Substanz in zwei verschiedenen Kon-

zentrationen in die Mikropipette gefüllt. Der Konzentrationsunterschied betrug immer eine Zehnerpotenz. Bei mikroiontophoretischer Applikation wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung in Abhängigkeit von der Phoresestromstärke bestimmt (siehe dazu auch Abb.III.10).

III. ERGEBNISSE

In die vorliegende Arbeit wurden 325 extrazellulär abgeleitete neokortikale Neurone einbezogen. Etwa 80% der Neurone wurden aus den Kortexschichten III-V abgeleitet. In diesen Schichten liegen vorwiegend größere Pyramidenzellen (siehe auch II.2.). Während des Eindringens der Elektrode in den Kortex wurden kurze iontophoretische Pulse von L-Glu (30-100 nA/1-5 sec) appliziert, um nicht spontanaktive Neurone zu aktivieren. Die Latenzzeit für die Wirkung von mikroiontophoretisch appliziertem L-Glu (30-120 nA) und GABA (5-60 nA) betrug bei den hier verwendeten Iontophoreseströmen 1-3 Sekunden. Etwa 30% der abgeleiteten neokortikalen Neurone war spontanaktiv (0.5-60 Entladungen/sec). Die Entladung spontanaktiver oder durch L-Glu aktivierter Neurone wurde durch mikroiontophoretisch appliziertes GABA gehemmt. Die Phoreseseströme für GABA wurden so gewählt, daß die Entladungstätigkeit des Neurons um 50-80% gehemmt wurde. Nur Neurone, die über 5-10 Minuten reproduzierbar auf mikroiontophoretisch appliziertes L-Glu und GABA antworteten, verwendeten wir für die weiteren Untersuchungen. Die Applikationsdauer (Iontophorese und Mikrosuperfusion) bei den Testsubstanzen betrug 1-20 Minuten. Die Applikationen wurden 2-5 mal wiederholt. Die Phoresesestromstärken zur Applikation der Testsubstanzen betrugen zwischen 20-300 nA. Die Druckwerte für die Mikrosuperfusion betrugen 10-30 kPa.

III.1. Ergebnisse der Untersuchungen mit Carbamazepin

Die Wirkung von Carbamazepin (CBZ) wurde an 50 Neuronen getestet. CBZ ist nicht wasserlöslich und wurde deshalb in 25%iger DMSO-Lösung oder 10%igem Alkohol gelöst. Bei jeder Applikation wurde deshalb auch eine Lösungsmittel-Kontrolle gemacht. Wir bezogen nur Neurone in die Untersuchung ein, bei denen die Lösungsmittelapplikation (mikroiontophoretisch oder durch Mikrosuperfusion) keine Veränderung der Entladungstätigkeit des Neurons hervorrief (Abb. III.1).

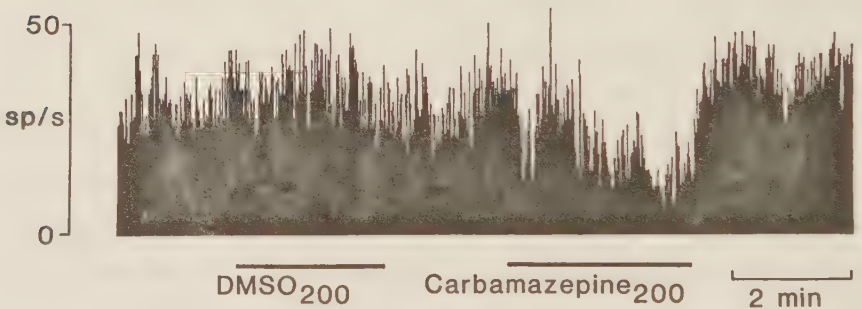


Abb. III.1 Die Wirkung von CBZ auf die spontane Entladungstätigkeit eines kortikalen Neurons. Die Abbildung zeigt das Frequenz-Zeit-Histogramm eines spontan-aktiven Neurons. Die Balken zeigen die Applikation des Lösungsmittels DMSO (200 nA) und CBZ (200 nA) an. Die Indices geben die Elektrophoresestromstärke in nano Ampere (10^{-9} A) an.

Die Abbildung zeigt die Hemmung eines spontanaktiven Neurons durch iontophoretische Applikation von CBZ (200 nA). Durch die Applikation von DMSO (200 nA) wird die Entladungstätigkeit des Neurons nicht beeinflusst. Der hemmende Effekt von CBZ tritt nach 80 Sekunden auf und ist nach etwa 40 Sekunden reversibel.

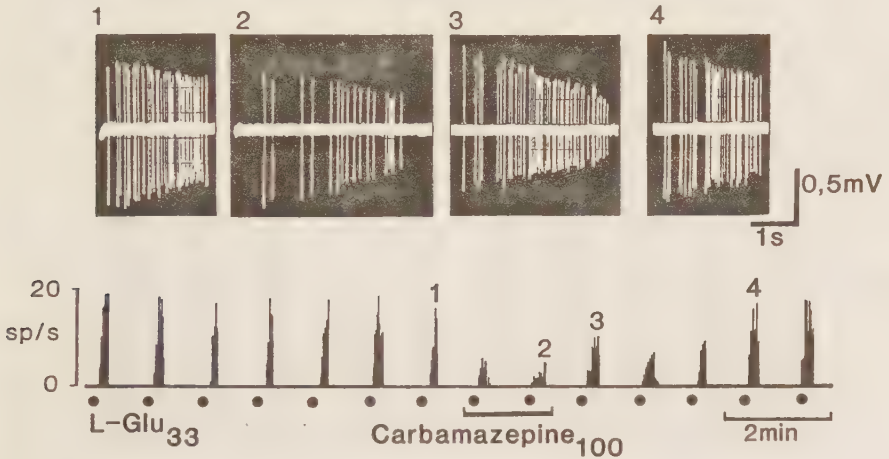


Abb. III.2 Die Wirkung von CBZ auf ein L-Glu-aktiviertes Neuron. CBZ (100 nA/120 sec) reduziert die durch iontophoretisch appliziertes L-Glu (33 nA/15 sec) hervorgerufenen Aktionspotentiale. Die schwarzen Punkte zeigen das Einschalten des Phoresestromes für L-Glu an. Die Indices geben die Phoreseströme in nA an. Die Originalabbildungen 1-4 zeigen die Aktionspotentiale an den entsprechend angegebenen Punkten im Frequenz-Zeit-Histogramm.

Iontophoretisch oder durch Mikrosuperfusion appliziertes CBZ hemmte die L-Glu-induzierte Aktivität an 24 Neuronen. Der Hemmeffekt trat nach 10-120 Sekunden auf. Die mittlere Reversionszeit lag im Bereich von 2-5 Minuten.

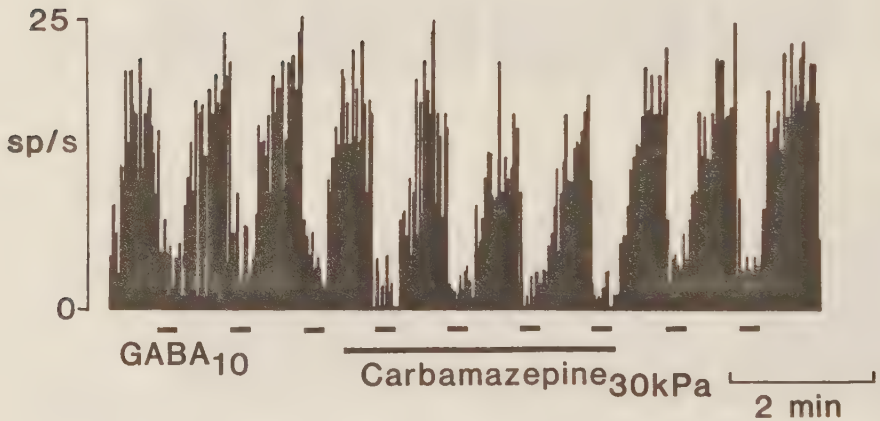


Abb.III.3 Interaktion zwischen GABA und CBZ. Die Balken geben die iontophoretische Applikation von GABA (10 nA/ 20 sec) bzw. die Applikation von CBZ (10⁻⁵M; 30 kPa) durch Mikrosuperfusion an. Die Abbildung zeigt eine Hemmung der neuronalen Aktivität durch CBZ ohne erkennbare Veränderung der Wirkung von GABA.

Die Phoreseströme für die GABA-Applikation wurden üblicherweise so gewählt, daß die neuronale Aktivität um 50-80% gehemmt wurde. Eine Hemmung der Entladungsaktivität durch CBZ wurde an 23 Neuronen beobachtet. Eine Verstärkung der hemmenden Wirkung von GABA durch CBZ konnte bei diesen Versuchen nur an 2 Neuronen gezeigt werden. Bei der überwiegenden Anzahl der Tests zeigte sich lediglich ein additiver Effekt auf die Hemmwirkung von GABA. An 5 spontanaktiven Neuronen bewirkte CBZ keine Veränderung der Entladungstätigkeit (siehe Tabelle III.1).

In einem weiteren Versuchsansatz hemmten wir die durch L-Glu hervorgerufenen Aktionspotentiale (7 Neurone) um etwa 50% durch iontophoretisch appliziertes GABA (5-35 nA/20 sec) und applizierten dann CBZ. Bei dieser Versuchsanordnung zeigte sich an 3 Neuronen eine Abschwächung der hemmenden Wirkung von GABA. An 4 Neuronen wurden durch CBZ die durch L-Glu hervorgerufenen Aktionspotentiale gehemmt, ohne daß die hemmende Wirkung von GABA verändert wurde.

Die Wirkung von CBZ auf

	die Spontan- aktivität	L-Glu-aktivierte Neurone
Verstärkung der hemmenden Wirkung von GABA:	2	0
Abschwächung der hemmenden Wirkung von GABA:	0	3
Keine Veränderung der GABA-Wirkung:	15	4
Hemmung:	9	14
Erregung:	2	0
Keine Veränderung:	1	5

Tabelle III.1 Übersicht über die Ergebnisse mit CBZ

III.2. Die Wirkungen von Valproat

Valproat (VAP) wurde insgesamt an 88 Neuronen getestet. VAP (30-200 nA) reduzierte die Entladungstätigkeit spontan-aktiver und durch L-Glu aktivierte Neurone. Davon waren 41 Neurone durch kurze, iontophoretisch applizierte L-Glu-Pulse aktiviert. Bei 33 Neuronen trat durch die Applikation von VAP eine Verminderung der Entladungstätigkeit auf. Bei 6 Neuronen zeigte sich eine Verstärkung der erregenden Wirkung von L-Glu. Drei Neurone veränderten ihre Entladungsrate nicht. Von den

spontanaktiven Neuronen zeigten 17 eine Abnahme und 4 eine deutliche Zunahme ihrer Entladungstätigkeit. Ein Neuron wurde durch VAP nicht beeinflusst. Durch die Applikation von VAP wurde die hemmende Wirkung von GABA an 20 Neuronen verstärkt. An 17 Neuronen trat eine Abschwächung der hemmenden Wirkung von GABA auf.

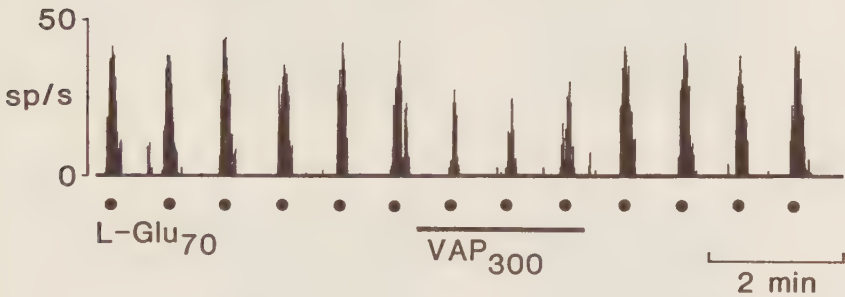


Abb. III.4 Valproat hemmt ein L-Glu-aktiviertes Neuron. Die Abbildung zeigt ein Frequenz-Zeit-Histogramm. Die schwarzen Punkte markieren die iontophoretische Applikation von L-Glu (70 nA/15 sec), der Balken die Applikation von VAP (300 nA/2,3 min).

Die L-Glu-induzierte Entladungsaktivität des in Abb.III.4 gezeigten Neurons wird durch iontophoretisch appliziertes VAP (300 nA/2,5 min) nach etwa 30 Sekunden gehemmt. Die Reversion dieses Hemmeffekts beginnt nach 30 Sekunden.

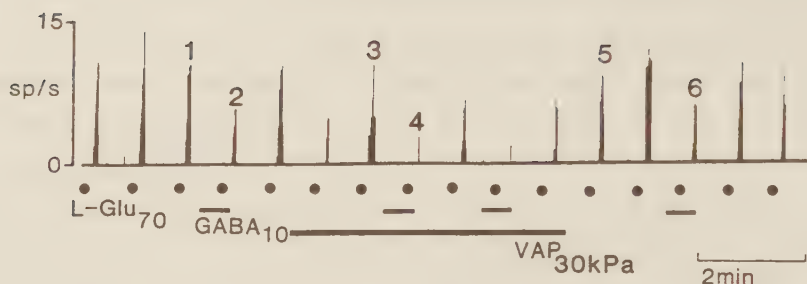


Abb. III.5 Interaktion zwischen GABA und Valproat. Die Abbildung zeigt das Frequenz-Zeit-Histogramm eines durch L-Glu (70 nA/15 sec) aktivierten Neurons. Die schwarzen Punkte zeigen die L-Glu-Pulse, die Balken die GABA (10 nA/20 sec) bzw. die VAP-Applikation durch Mikrosuperfusion (10^{-5} M; 30 kPa). (Zahlen 1-6, siehe Abb. III.6)

Bei der in Abb III.5 gezeigten Ableitung wird die L-Glu-induzierte Entladungstätigkeit durch GABA um 50% gehemmt. Die hemmende Wirkung von GABA wird durch VAP (appliziert durch Mikrosuperfusion mit einer Druckstärke von 30 kPa) verstärkt.

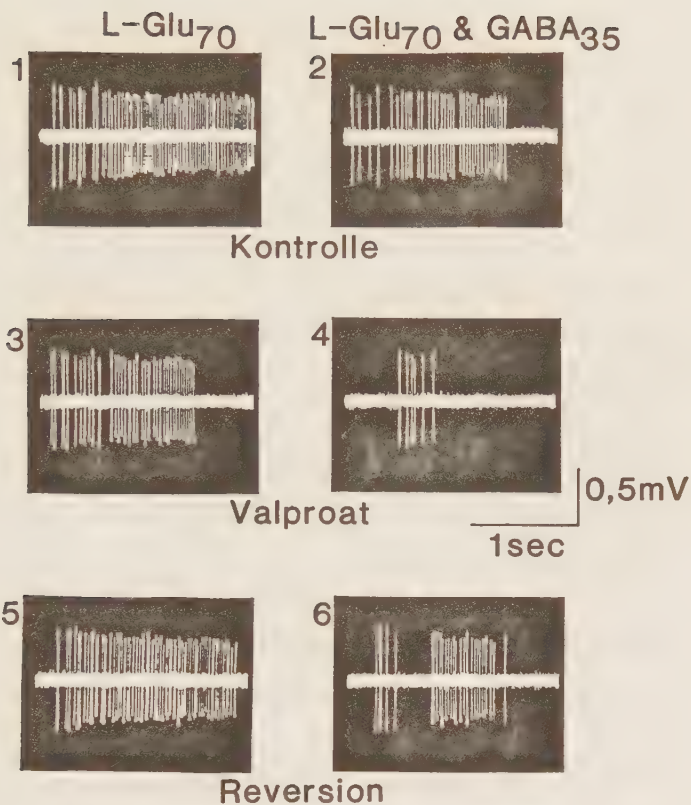


Abb. III.6 Die Originalabbildungen (1-6) zeigen die Verstärkung der hemmenden Wirkung von GABA durch Valproat. Sie entsprechen den jeweiligen Ableitungen an den markierten Stellen in Abb.III.5

Die Wirkung von Valproat auf

	die Spontan- aktivität	L-Glu-aktivierte Neurone
Verstärkung der hemmenden		
Wirkung von GABA:	5	15
Abschwächung der hemmenden		
Wirkung von GABA:	4	13
Hemmung:	17	33
Erregung:	4	6
Kein Effekt:	1	3

Tabelle III.2 Überblick über die Wirkungen von Valproat an 88
abgeleiteten Neuronen

Diese Untersuchungen zeigen, daß Valproat die Entladungstätigkeit spontanaktiver Neurone und L-Glu-aktivierter Neurone hemmt. Die GABA-induzierte Hemmung wurde durch Valproat verstärkt. An einigen Neuronen verminderte Valproat den hemmenden Effekt von iontophoretisch appliziertem GABA .

III.3. Die Wirkung von Progabide

Für elektrophysiologische Untersuchungen ist Progabide (PGB) wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit nicht geeignet. Wir verwendeten deshalb in dieser Untersuchung seinen aktiven Metaboliten Progabide SL 75102. In Konzentrationen von 10^{-4} - 10^{-5} M wurde er durch Mikrosuperfusion an 40 extrazellulär abgeleiteten Neuronen getestet. Dabei zeigten 12 von 16 durch L-Glu-aktivierte Neurone auf die Applikation von PGB keinen Effekt. An 3 Neuronen trat eine Hemmung auf; 1 Neuron reagierte mit einer Zunahme der Entladungstätigkeit. Bei 15 von 19 spontanaktiven Neuronen produzierte die Applikation von Progabide keinen Effekt; 4 wurden durch PGB gehemmt.

Bei den Interaktionsstudien mit GABA zeigte PGB eine deutliche Verstärkung der hemmenden Wirkung von iontophoretisch appliziertem GABA.

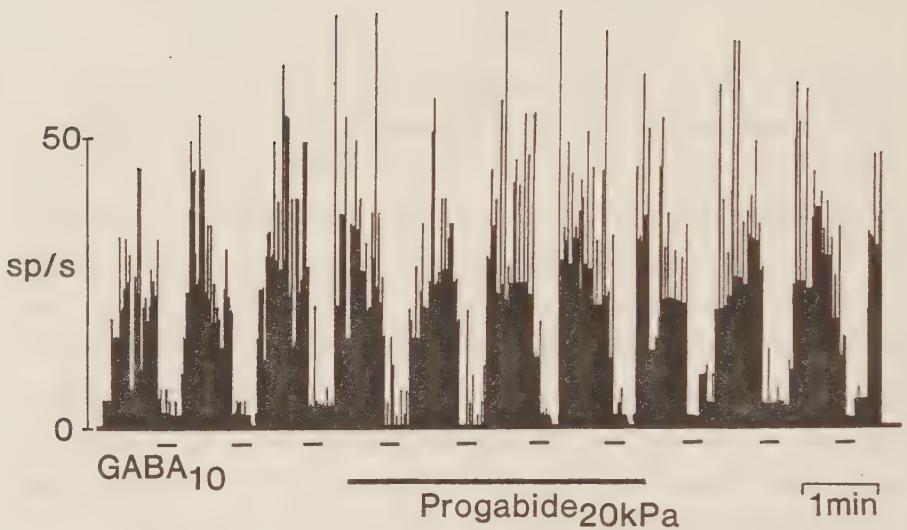


Abb. III.7 PGB verstärkt die GABA-Antwort, ohne die Spontanaktivität des Neurons zu beeinflussen. Das Frequenz-Zeit-Histogramm zeigt ein spontanaktives Neuron, das in regelmäßigen Abständen durch iontophoretisch appliziertes GABA (10 nA/20 sec) (Balken) gehemmt wird. Die Applikation von PGB (10^{-5} M) erfolgt durch Mikrosuperfusion (20 kPa/5 min).

Die Amplitude der Aktionspotentiale zeigte bei der Applikation von PGB keine Veränderung. Die Applikation von PGB durch Mikrosuperfusion hatte keinen Einfluß auf die durch L-Glu evozierte Entladungstätigkeit.

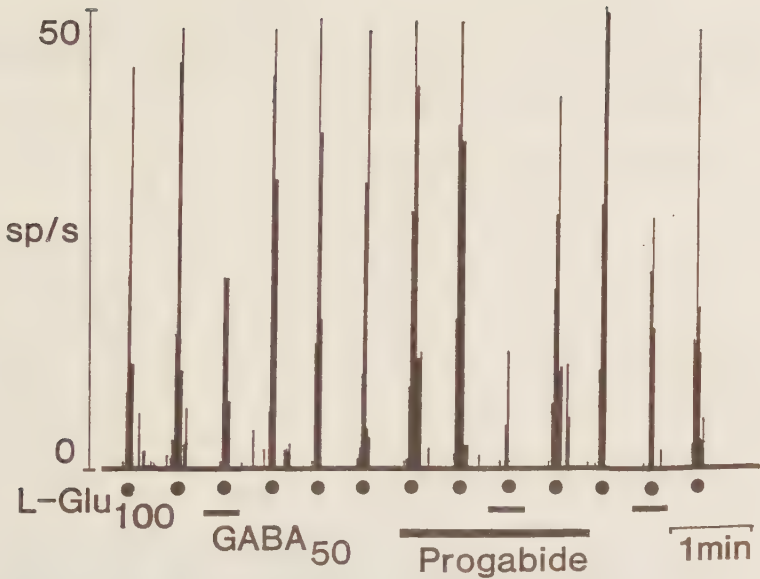


Abb. III.8 PGB ist ohne Einfluß auf L-Glu-aktivierte Entladungstätigkeit, aber verstärkt die durch GABA induzierte Hemmung. Die Abbildung zeigt ein durch L-Glu (100 nA/10 sec) aktiviertes Neuron. Die Entladungstätigkeit des Neurons wird durch pneumatische Applikation von PGB (10^{-5} M; 30 kPa/2,5 min) nicht verändert. Iontophoretisch appliziertes GABA (50 nA/20 sec) reduziert die durch L-Glu hervorgerufene Aktivität und verstärkt bei gleichzeitiger Applikation von PGB seine hemmende Wirkung.

Die Wechselwirkung von iontophoretisch appliziertem GABA mit PGB wurde an 27 Neuronen untersucht. Dabei produzierten 14 Neurone bei gleichzeitiger Gabe von PGB eine Verstärkung der

hemmenden Wirkung von GABA. Bei 9 Neuronen zeigte sich eine Abschwächung der durch GABA hervorgerufenen Hemmung (GABA-antagonistischer Effekt). An 4 Neuronen zeigte PGB keinen Effekt auf die hemmende Wirkung von GABA.

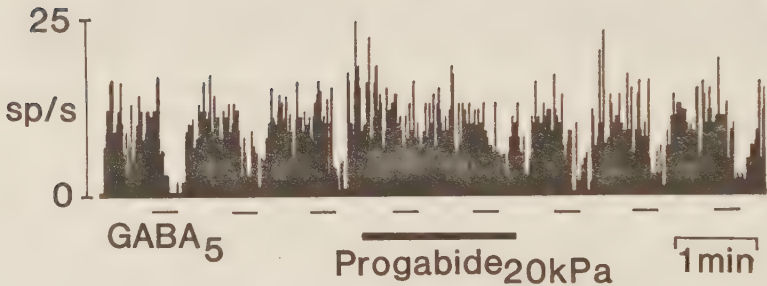


Abb. III.9 GABA-antagonistischer Effekt von PGB. Ein spontan-aktives Neuron wird durch die Applikation von GABA (5 nA/20 sec) gehemmt. Bei gleichzeitiger pneumatischer Applikation von PGB (10^{-5} M; 20 kPa/ 2 min) wird die hemmende Wirkung von iontophoretisch appliziertem GABA abgeschwächt.

Die Wirkung von PGB auf

	die Spontan- aktivität	L-Glu aktivierte Neurone
Verstärkung der hemmenden		
Wirkung von GABA:	2	12
Abschwächung der hemmenden		
Wirkung von GABA:	3	6
Kein Effekt auf		
die GABA-Wirkung:	0	4
Hemmung:	4	3
Steigerung:	0	1
Kein Effekt:	15	12

Tabelle III.3 Übersicht über die Ergebnisse mit PGB

Die Untersuchungen mit PGB zeigen, daß PGB die Entladungstätigkeit spontanaktiver und L-Glu-aktivierter Neurone nicht beeinflusst. PGB führt zu einer Verstärkung der hemmenden Wirkung von GABA. An einigen Neuronen bewirkt PGB eine Abschwächung der hemmenden Wirkung von GABA.

III.4. Die Wirkung von Benzodiazepinen

Die Wirkung von Chlordiazepoxid (Cdpx) wurde an 55 Neuronen getestet. Cdpx wurde sowohl iontophoretisch (50-300 nA) als auch durch Mikrosuperfusion (10-30 kPa) appliziert. Cdpx hemmte

spontanaktive und durch iontophoretisch appliziertes L-Glu aktivierte Neurone.

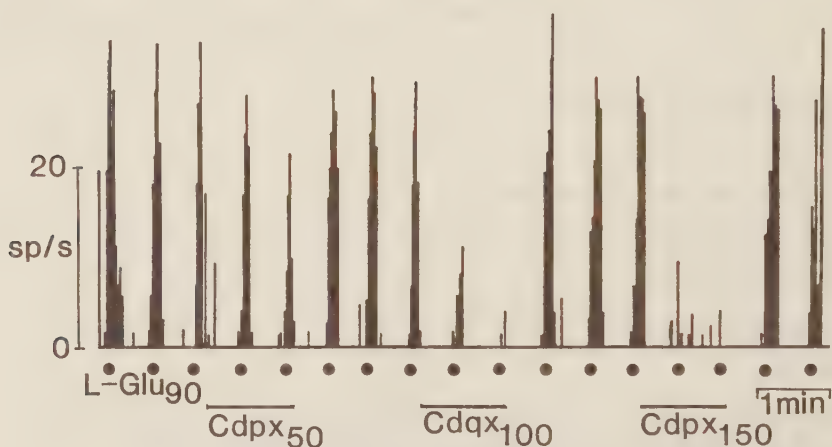


Abb. III.10 Cdpx hemmt die Entladungstätigkeit eines durch L-Glu aktivierten Neurons. Die Abbildung zeigt die Entladungstätigkeit eines Neurons, hervorgerufen durch iontophoretisch appliziertes L-Glu (90 nA/15 sec). Die Applikation von Cdpx (50, 100, 150 nA/1,3 min) führt zu einer dosisabhängigen Zunahme der Hemmung durch Cdpx.

Bei 20 von 34 L-Glu-aktivierten Neuronen hemmt Cdpx die chemisch induzierte Entladungstätigkeit; 12 Neurone zeigten eine deutliche Zunahme der Entladungsaktivität; 2 Neurone wurden nicht beeinflusst. Bei 3 von 5 spontantätigen Neuronen kam es zu einer Reduzierung der Spontanfrequenz; 1 Neuron reagierte mit einer Erregung; 1 Neuron zeigte keinen Effekt.

Bei den Interaktionsuntersuchungen mit GABA reagierten 9 von 25 Neuronen mit einer Verstärkung der hemmenden Wirkung von GABA; bei 12 Neuronen wurde die hemmende Wirkung von GABA abgeschwächt.

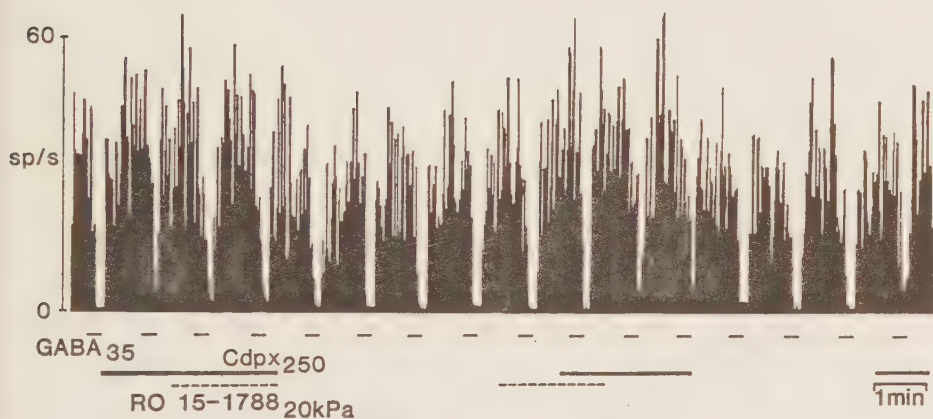


Abb. III.11 Interaktion zwischen Cdpx, GABA und dem Benzodiazepin-Antagonisten Ro 15-1788. Die Entladungsaktivität eines spontanaktiven Neurons wird durch die Applikation von GABA (35 nA/20 sec) gehemmt. Die Applikation von Cdpx (250 nA/3 min) führt zu einer Abschwächung der Hemmwirkung von GABA, die durch pneumatisch appliziertes Ro 15-1788 (10^{-5} M; 20 kPa/2,5 min) antagonisiert wird. Diese Interaktionen wurden an diesem Neuron fünfmal reproduziert (Gesamtableitungsdauer: >2 Stunden).

Die Abschwächung der hemmenden Wirkung von GABA (35 nA/20 sec) bei gleichzeitiger Applikation von Cdpx, wurde durch pneumatisch appliziertes Ro 15-1788 (10^{-5} - 10^{-4} M; 20 kPa) antagonisiert. Eine leichte Zunahme der Entladungstätigkeit des Neurons durch die Applikation von Cdpx trat auf, während Cdpx die durch GABA ausgelöste Hemmung abschwächte.

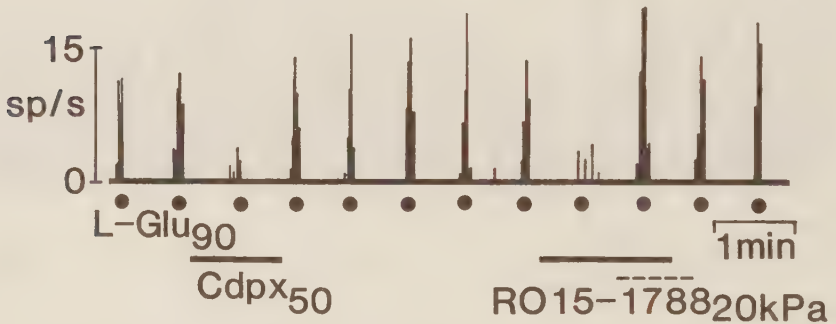


Abb. III.12 Interaktion zwischen Cdpx, L-Glu und Ro 15-1788. Die hemmende Wirkung von iontophoretisch appliziertem Cdpx (50 nA/3 min; Balken) auf ein L-Glu(90 nA/12 sec; Punkte)-aktiviertes Neuron wird durch Ro 15-1788 (10^{-5} M; 20 kPa; unterbrochener Balken) antagonisiert.

Cdpx zeigte seine hemmende Wirkung auf die Entladungen L-Glu-aktivierter Neurone auch nach mikroiontophoretischer Applikation. Dieser Effekt konnte durch Ro 15-1788 (10^{-5}M), appliziert durch Mikrosuperfusion (20 kPa), antagonisiert werden.

III.5. Die Wirkung von Midazolam

5. a) Pneumatische Applikation

Midazolam (Mz) wurde durch Mikrosuperfusion (10 -30 kPa) in Konzentrationen von 10^{-4} - 10^{-6}M appliziert.

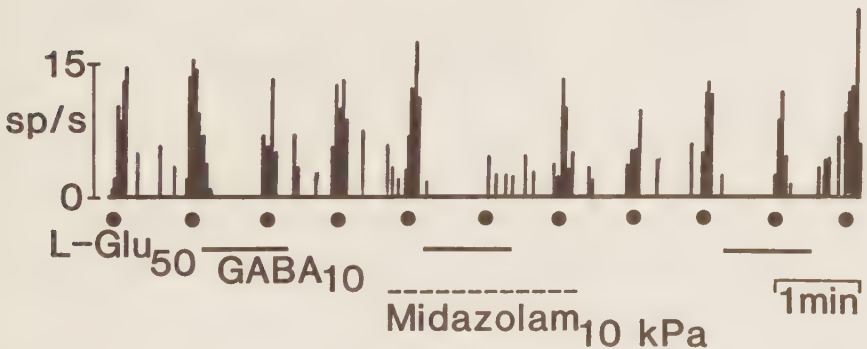


Abb. III.13 Interaktion zwischen Mz, GABA und L-Glu. Die Entladungsaktivität eines durch L-Glu (50 nA/15 sec; Punkte) aktivierten Neurons wird durch GABA (10 nA/60 sec; Balken) gehemmt. Diese Hemmwirkung von GABA wird durch pneumatische Applikation von Mz (10^{-6}M ; 10 kPa; unterbrochener Balken) verstärkt.

Der in Abb.III.13 wiedergegebene Effekt trat an 12 von 15 L-Glu-aktivierten Neuronen auf. Nur 2 Neurone reagierten mit einer Steigerung ihrer Entladungsaktivität nach Applikation von Mz. Drei Neurone zeigten keine Beeinflussung ihrer Entladungsaktivität durch die Applikation von Mz. Bei 5 von 10 spontanaktiven Neuronen trat unter Mz eine Abahme der Entladungstätigkeit auf.

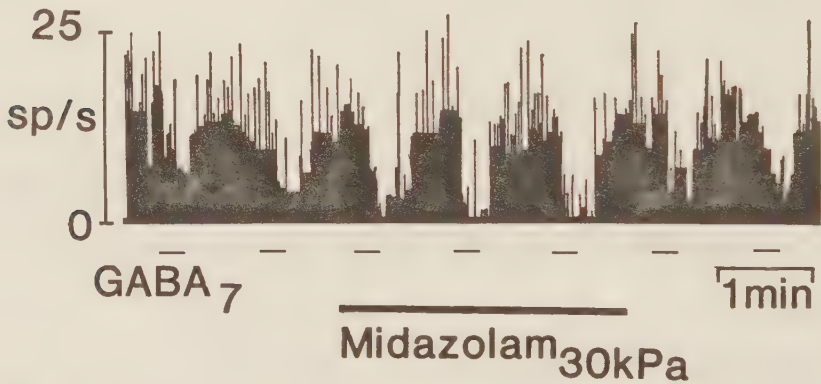


Abb. III.14 Interaktion zwischen GABA und Mz. Das spontanaktive Neuron wurde durch iontophoretisch appliziertes GABA (7 nA/20 sec) gehemmt. Die pneumatische Applikation von Mz (10^{-5} M; 30 kPa) verstärkte den hemmenden Effekt von GABA.

In 23 von 39 abgeleiteten Neuronen bewirkte Mz (10^{-4} - 10^{-5} M) eine Verstärkung der durch GABA hervorgerufenen Hemmung. Bei 8 Neuronen wurde die durch GABA induzierte Hemmung abgeschwächt. Acht Neurone zeigten unter Mz keine Veränderung ihrer Entladungsaktivität.

Benzodiazepin - Wirkung auf

	Spontanaktivität L- Glu aktivierte i.p. Applikation					
	Neurone					
	Mz	Cdpx	Mz	Cdpx	Mz	Cdpx
Verstärkung der hemmenden Wirkung von GABA	6	3	18	6		
Verminderung der hemmenden Wirkung von GABA	4	4	4	8		
Kein Effekt auf die GABA Wirkung	2	1	6	3		
Erregungshemmung	5	3	12	20	11	2
Erregungsteigerung	-	1	2	12	1	1
Kein Effekt	-	1	3	2	-	-

Tabelle III.4 Übersicht über die Ergebnisse mit den Benzodiazepinen

Ro 15-1788 (10^{-5} M) antagonisierte sowohl den hemmenden als auch den aktivierenden Einfluß der Benzodiazepine auf die Entladungstätigkeit der Neurone.

III.5. b) Intraperitoneale Applikation

An 14 Tieren wurde Mz in einer Dosis von 12 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Mz reduzierte die Entladungsaktivität des registrierten Neurons bereits nach 1-3 Minuten (siehe Abb.III.15). Dieser Effekt war nach 40-60 Minuten wieder reversibel. Die durch intraperitoneal lokal appliziertes Mz reduzierte Entladungstätigkeit des Neurons war durch pneumatisch appliziertes Ro 15-1788 (10^{-4} - 10^{-6} M) nicht antagonisierbar.

In 11 von 14 untersuchten Neuronen wurde nach einer Stunde ein zweites Mal die gleiche Dosis Mz intraperitoneal appliziert. Diese zweite Injektion löste an keinem der Neurone eine Reduzierung der Entladungsaktivität aus (siehe Abb. III.15).

Drei Tieren wurde nach einer weiteren Stunde Ro 15-1788 in einer Dosis von 8 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Nach 1-4 Minuten war der Wirkungseintritt von Ro 15-1788 an einer Zunahme der Entladungstätigkeit des registrierten Neurons erkennbar.

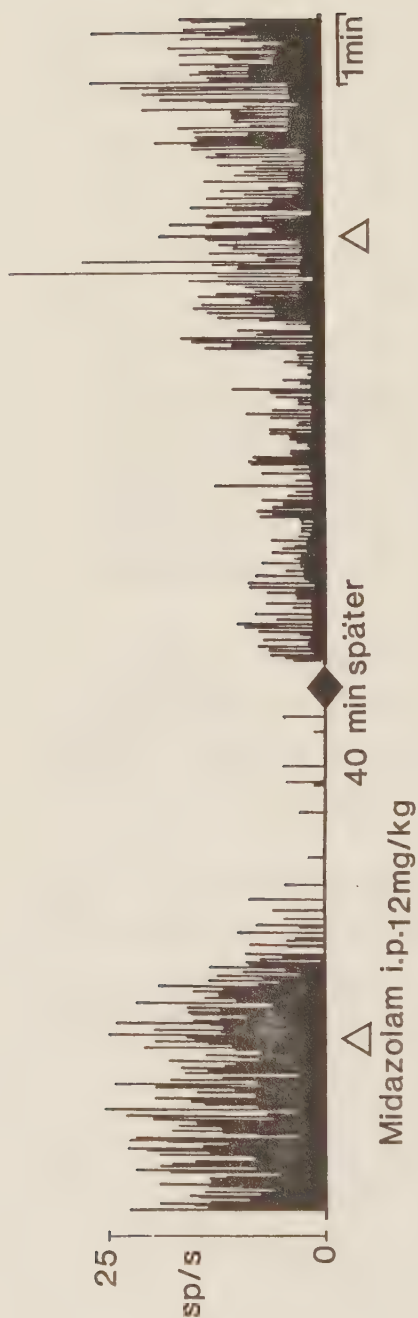


Abb. III.15

Intraperitoneale Applikation von Mz. Das Dreieck (Δ) zeigt die Applikation von Mz (12 mg/kg Körpergewicht) an. Die Entladungsaktivität des spontanaktiven Neurons wird durch intraperitoneal appliziertes Mz gehemmt. Nach etwa 30 Minuten beginnt die Reversion der Spontanaktivität des Neurons. Eine zweite Injektion von Mz (12 mg/kg) nach einer Stunde hat keinen Einfluß auf die Entladungstätigkeit des Neurons.

III.10. Die Wirkung von Ro 15-1788

Die Wirkung von Ro 15-1788 wurde an 30 Neuronen getestet. Ro 15-1788 zeigte keine Wirkung auf die Entladungstätigkeit L-Glu-aktivierter oder spontanaktiver Neurone. Es antagonisierte jedoch die Wirkungen von iontophoretisch appliziertem Cdpx (90 nA). Aus den Abb. III.13 und III.14 ist ersichtlich, daß Ro 15-1788 sowohl den GABA-verstärkenden als auch den GABA-antagonisierenden Effekt der Benzodiazepine antagonisiert. Ro 15-1788 wurde in Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} M durch Mikrosuperfusion appliziert. Die Hemmung der Entladungstätigkeit, ausgelöst durch intraperitoneale Applikation von 12 mg/kg Mz, konnte durch pneumatische Applikation von Ro 15-1788 nicht antagonisiert werden. Allerdings antagonisierte Ro 15-1788 nach intraperitonealer Applikation die hemmende Wirkung von Mz an allen untersuchten Neuronen (3) nach 1-4 Minuten.

	Spontan- aktivität	L-Glu- aktivierte Neurone	i.p.-Appli- kation
Verstärkung der hemmenden Wirkung von GABA:	2	11	
Verminderung der hemmenden Wirkung von GABA:	1	5	
Antagonisierung der hemmenden Wirkung von Midazolam nach i.p. Applikation:			6
Keine Wirkung auf die Entladungstätigkeit:	7	15	

Tabelle III.5 Übersicht über die Ergebnisse mit dem Benzo-
diazepin-Antagonisten Ro 15-1788.

IV. DISKUSSION

IV.1. CBZ und seine hemmende Wirkung auf L-Glu und GABA

CBZ hat seit seiner Einführung als Antikonvulsivum vor 20 Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Wegen der geringen Nebeneffekte auf die Psyche und das Verhalten im Vergleich zu Phenytoin oder Phenobarbital, konnte die Behandlung eines breiten Spektrums der zerebralen Anfallsleiden durch CBZ verbessert werden (Evans und Gualtieri, 1985). Bei den meisten Anfallsleiden, ausgenommen den petit-mal Anfällen, wird CBZ heute als das Mittel der Wahl empfohlen. Bei der Behandlung der Trigeminusneuralgie und der Glossopharyngeusneuralgie zeigt CBZ einen schnellen Wirkungseintritt (Hernandez-Peon, 1965). Der therapeutische Nutzen von CBZ bei der Behandlung der bipolaren Psychosen und der schizoaffektiven Psychosen ist heute durch mehrere klinische Studien belegt. Derzeit herrscht noch keine Klarheit darüber, ob sich CBZ auch bei den genannten psychiatrischen Erkrankungen als Medikament durchsetzen wird (Evans und Gualtieri, 1985).

CBZ unterdrückt die Ausbreitung von paroxysmalen neuronalen Entladungen und bewirkt eine Abnahme der post-tetanischen Potenzierung (Krupp, 1969). Es reduziert die Entladungsaktivität im N. ventralis anterior des Thalamus, einer Hirnstruktur, die an der Generalisierung und Ausbreitung zerebraler Krampfanfälle beteiligt ist (Holm und Mitarbeiter, 1970). CBZ unterdrückt die Entladungen in efferenten und afferenten Systemen des Thalamus.

Diese Verbindungen umfassen Projektionen vom Nucleus amygdalae und Hippocampus (Morselli und Bossi, 1982; Sillanpaa, 1981).

CBZ ist eine lipophile Substanz, die Membranen leicht passiert und sich in verschiedenen Organgeweben verteilt, ohne eine Affinität zu einem besonderen Gewebe zu zeigen (Sillanpaa, 1981). An Plasmaproteine gebundenes CBZ ist biologisch inaktiv (Sillanpaa, 1981). In einer Plasmakonzentration von 4-5 µg/ml ist CBZ in der Lage, elektrisch oder medikamentös provozierte epileptische Anfälle zu unterdrücken (Sillanpaa, 1981).

Derzeit gibt es verschiedene Hypothesen zum Wirkungsmechanismus dieses Iminostilben-Derivates, das chemisch dem trizyklischen Antidepressivum Imipramin gleicht. In Konzentrationen, die auch unter klinischen Bedingungen erreicht werden, ist CBZ, in in vitro-Studien verglichen mit Imipramin, ein um 75% schwächerer Noradrenalin-reuptake-Blocker (Purdy und Mitarbeiter, 1977). Biochemische Studien haben gezeigt, daß die Freisetzung von Noradrenalin durch CBZ reduziert wird. Da CBZ jedoch ein potenteres Antikonvulsivum ist als Imipramin, ist es unwahrscheinlich, daß vorwiegend noradrenerge Mechanismen mit den antikonvulsiven Eigenschaften von CBZ in Zusammenhang stehen (Evans und Gualtieri 1985).

CBZ hemmt die Bindung von Adenosin an neuronale Membranen. Aus diesem Grunde wurde die Interaktion von CBZ mit purinergen Übertragungsmechanismen untersucht (Skerritt und Mitarbeiter, 1982). In Untersuchungen an Einzelzellen des Rattenkortex wurde nachgewiesen, daß CBZ die Wirkung von iontophoretisch applizier-

tem Adenosin nicht verstärkt. In höheren Dosierungen antagonisierte CBZ sogar den hemmenden Effekt von Adenosin (Phillis, 1984).

Es ist derzeit noch offen, ob CBZ seine Wirkungen durch eine Interaktion mit einem der bekannten Transmittersystemen hervorruft. Die Wirkungen von CBZ werden vermutlich über postsynaptisch lokalisierte Rezeptoren vermittelt. Diese Annahme stützt sich auf Untersuchungen, bei denen die synaptische Übertragung durch Erniedrigung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration blockiert war. Bei diesen Untersuchungen, die an Hirnschnittpräparaten des Hippocampus durchgeführt wurden, wurde die spontane epileptiforme Aktivität trotz einer Blockade der synaptischen Übertragung durch CBZ (und durch Valproat, siehe unten) unterdrückt. Der ionale Mechanismus dieser antikonvulsiven Wirkung ist derzeit noch unbekannt. Kürzlich veröffentlichte Befunde zeigten, daß CBZ an postsynaptischen Membranen hippocampaler Pyramidenzellen zu einer Erregungsminderung führt, ohne dabei mit spezifischen synaptischen Übertragungsmechanismen zu interferieren (Heinemann und Mitarbeiter, 1985).

Einen direkten, nicht über eine Interaktion mit Überträgerstoffsystemen vermittelten Effekt von CBZ, konnten Schauf und Mitarbeiter (1974) an peripheren Nervenfasern nachweisen. Diese intrazellulären Ableitungen (voltage-clamp) vom isolierten Tintenfischaxon zeigen, daß CBZ die Erregbarkeit peripherer Nerven unterdrückt, indem es die Natrium- und Kaliumleitfähigkeit herabsetzt. Allerdings bleibt offen, ob die Wirkung von CBZ am peripheren Nerven in Beziehung zu seinen antikonvulsiven Eigenschaften steht (Schauf und Mitarbeiter, 1974).

Durch eine Hemmung GABA metabolisierender Enzyme (siehe auch unten; VAP) erhöht CBZ den Gesamtgehalt von GABA im Gehirn (Sillanpaa, 1981). Überraschenderweise wurden jedoch keine Veränderungen des GABA-Spiegels bei Patienten mit bipolaren Psychosen gefunden, die günstig auf CBZ reagierten (Post und Mitarbeiter, 1982).

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung von CBZ auf L-Glu und GABA untersucht. L-Glu wurde im gesamten Zentralnervensystem des Säugetiers als häufigster erregender Neurotransmitter nachgewiesen (Fagg und Foster, 1983). Derzeit gilt L-Glu als wichtigster erregender Überträgerstoff im Neokortex für die Übertragung afferenter Signale zu den Pyramidenzellen. Vorausgesetzt, die Iontophoreseströme waren groß genug, löste L-Glu an allen untersuchten Neuronen Entladungen von Aktionspotentialen aus. CBZ reduzierte diese chemisch induzierte Entladungstätigkeit in den meisten Fällen (siehe z.B. Abb.III.2) ebenso wie die spontanen Entladungen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen konnte kein Hinweis auf eine Verstärkung GABAerger Übertragungsmechanismen durch CBZ gefunden werden. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen an kortikalen Neuronen sind Befunde an hippocampalen Pyramidenzellen in vitro. An diesen Neuronen wirkt CBZ auch hemmend auf exzitatorische neurohumorale Prozesse (Hood und Mitarbeiter, 1983; Olpe und Mitarbeiter, 1985). Bei diesen in vitro-Untersuchungen zeigte sich, daß CBZ über prä- und postsynaptische Angriffspunkte die durch L-Glu aktivierte Entladungstätigkeit reduziert.

Es ist noch offen, in welchem Ausmaß die postulierten monoaminergen und purinergen Mechanismen in diese synaptischen Prozesse eingebunden sind (Emrich und Mitarbeiter, 1984; Julien und Hollister, 1975; Suria und Killam, 1980).

IV.2. Die neurophysiologischen und neurochemischen Wirkungsmechanismen von VAP

VAP ist als Antikonvulsivum besonders wirksam bei petit-mal Anfällen, findet aber darüber hinaus auch Anwendung bei anderen zerebralen Anfallsleiden (Olpe und Mitarbeiter, 1985). In den letzten Jahren wurden mehrere klinische Studien veröffentlicht, die die antimanischen und antipsychotischen Wirkungen von VAP dokumentieren (Emrich und Mitarbeiter, 1984). Es ist allerdings noch offen, ob VAP durch eine Indikationserweiterung zur Behandlung von bipolaren Psychosen eingesetzt werden kann.

Die molekularen Mechanismen, durch die VAP seine antikonvulsiven und antimanischen Wirkungen erzielt, sind noch weitgehend ungeklärt (Ticku und Davis, 1981). Frühere neurochemische Arbeiten über die Wirkungsweise von VAP beschreiben eine Erhöhung des GABA-Spiegels im Gehirn infolge eines Eingriffs in den GABA-Metabolismus. GABA wird in GABAergen Neuronen durch Decarboxylation aus der Glutaminsäure gebildet. Die Glutaminsäure Decarboxylase (GAD) ist Pyridoxal-Phosphat-abhängig. Ein durch VAP induzierter verstärkter Aufbau von GABA durch Glutaminsäure-decarboxylase wurde ebenso diskutiert (Godin und Mitarbeiter, 1969; Löscher und Frey, 1977; Pinder und Mitarbeiter, 1977; Van

der Laan und Mitarbeiter, 1979) wie eine Hemmung der GABA-abbauenden Enzyme, GABA-alpha-ketoglutaratamino-Transferase (GABA-T) und der Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (Godin und Mitarbeiter, 1969; Harvey und Mitarbeiter, 1975; Simler und Mitarbeiter, 1973). Die Relevanz dieser Beobachtungen für die antikonvulsive Wirkung von VAP ist durch verschiedene andere Untersuchungen in Frage gestellt worden (Sawaya und Mitarbeiter, 1975; Schobben und Mitarbeiter 1980; Simler und Mitarbeiter, 1973). Zur Erzielung der antikonvulsiven Wirkungen reichen geringere VAP-Dosierungen aus, als zu einer Erhöhung des GABA-Spiegels nötig sind. Deshalb läßt sich ein Zusammenhang mit einer Erhöhung des GABA-Spiegels im Gehirn und der antikonvulsiven Wirkung von VAP nicht ohne weiteres herstellen (Anlezark und Mitarbeiter, 1976). Der durch VAP induzierte Anstieg der GABA-Konzentration im Gehirn, scheint nicht primär für die Verstärkung der GABAergen Hemmung verantwortlich zu sein. Kervin verdeutlichte das 1980 mit Untersuchungen an Ratten, bei denen die Konzentration von GABA im Gehirn durch Vorbehandlung mit GABAcullin maximal erhöht war. Wie unter Kontrollbedingungen, führte die iontophoretische Applikation von VAP an diesen Tieren zu einem GABA-verstärkenden Effekt (Kerwin und Mitarbeiter, 1980). Mehrere Mechanismen wurden postuliert, um diese Verstärkung der GABA-Antwort durch VAP zu erklären. Es wird u.a. die Möglichkeit diskutiert, daß GABA länger im synaptischen Spalt verweilt, da VAP die Wiederaufnahme in die Nervenzellen oder in die Gliazellen hemmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der iontophoretischen Applikation von VAP auf kortikale Neurone eine Abnahme der Entladungstätigkeit spontanaktiver und L-Glu-aktivierter Neurone

gefunden. Die Verstärkung der GABA-induzierten Hemmung durch VAP war oft begleitet von einer Abnahme der Entladungsaktivität L-Glu-aktivierter und spontanaktiver Neurone (siehe z.B. Abb. III.4-6). Der schnelle Wirkungseintritt von VAP (<1 min) nach iontophoretischer Applikation spricht dafür, daß VAP seine Wirkung erzielt, ohne in den GABA-Metabolismus einzugreifen.

Die Beobachtung, daß VAP die inhibitorische GABA-Antwort auf neuronale Entladungen verstärkt, ist auch in Untersuchungen an anderen Hirnstrukturen gefunden worden. So wurde die hemmende Wirkung von iontophoretisch appliziertem GABA in der Substantia nigra (Kerwin und Mitarbeiter, 1980) und in der Medulla oblongata (Gent und Phillips, 1980) durch phoretisch appliziertes VAP verstärkt. Von Baldino und Geller (1981a) wurde die Beeinflussbarkeit der hemmenden Wirkung von Glycin durch VAP mit der von GABA im Kortex der Ratte verglichen. Sie berichteten übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, daß die durch GABA hervorgerufene Hemmung durch VAP im Kortex deutlich verstärkt wird, und daß dieser Effekt möglicherweise zur antikonvulsiven Wirkung von VAP beiträgt (Baldino und Geller, 1981a). Die Verstärkung der hemmenden Wirkung von GABA durch VAP scheint spezifisch für GABA, da eine Verstärkung anderer inhibitorischer Transmitter, wie z.B. Glycin, nicht beobachtet wurde (Baldino und Geller, 1981a). Hingegen wurde die hemmende Wirkung anderer iontophoretisch applizierter GABA-Agonisten, wie Muscimol, auch durch VAP verstärkt (Gent und Phillips, 1980; Kerwin und Mitarbeiter, 1980). In Zellkulturen von Neuronen aus dem ZNS potenziert VAP in niederen Konzentrationen die durch GABA ausgelöste Hemmung an der postsynaptischen Membran, ohne die durch iontophoretisch

appliziertes Glycin ausgelöste Hemmung zu beeinflussen (Macdonald und Bergey, 1979). Es erscheint daher unwahrscheinlich, daß die Wirkungsverstärkung GABAerger Prozesse durch VAP durch eine direkte Interaktion mit dem Chloridkanal entsteht. Es ist bekannt, daß dieser Ionenkanal sowohl durch GABA als auch durch Glycin aktiviert wird (Johnston und Mitarbeiter, 1978). Intrazelluläre Ableitungen aus Schneckenneuronen zeigen, daß VAP die Kaliumleitfähigkeit heraufsetzt, ein Effekt, der ebenfalls zu einer Reduzierung der Zellerregbarkeit führt (Julien und Hollister, 1975).

In wenigen Zellen wurde sowohl eine Zunahme der Entladungsfrequenz spontanaktiver und L-Glu-aktivierter Neurone als auch ein GABA-antagonistischer Effekt gefunden (Tab.III.2). In verschiedenen anderen Hirnregionen, z.B. im Hippocampus und im Hypothalamus, ist nach mikroiontophoretischer Applikation von VAP ebenfalls eine Verstärkung der neuronalen Entladungsaktivität durch Valproat beschrieben worden (Baldino und Geller, 1981b; Schmutz und Mitarbeiter, 1979). Baldino und Geller (1981b) nahmen auf Grund ihrer Befunde an, daß die Wirkung von VAP, nicht auf einer verminderten Erregbarkeit des einzelnen Neurons beruht, sondern in der Hemmung der Weiterleitung der neuronaler Impulse zu suchen ist, da sie auf iontophoretisch appliziertes VAP eine verstärkte Entladungstätigkeit beobachteten.

Da dieser Effekt auch bei den hier untersuchten GABA-Agonisten, z.B. bei PGB und den Benzodiazepinen, wie auch an einigen Zellen bei CBZ gelegentlich zu beobachten war, liegt die Vermutung nahe, daß es sich hier um eine Erregbarkeitssteigerung

durch Disinhibition handelt. Mit anderen Worten, inhibitorisch wirkende Interneurone werden durch iontophoretisch applizierte Substanzen gehemmt und vermindern so ihren inhibitorischen Einfluß auf das gerade abgeleitete Neuron (Zieglgänsberger und Mitarbeiter, 1979). Eine andere Erklärung für den GABA-antagonistischen Effekt und für die Erregungsverstärkung spontanaktiver und L-Glu-aktivierter Neurone durch die phoretische Applikation von VAP, den wir gelegentlich auch bei Benzodiazepinen und PGB sahen, können wir nicht geben.

IV.3. Wirkungen von Progabide

Progabide (PGB) ist eine antikonvulsiv wirkende Substanz, die sich noch in der klinischen Entwicklung befindet. Nach systemischer Applikation ist diese Substanz in der Lage, die Blut-Hirnschranke zu passieren. Im Organismus wird PGB zu PGB SL 75102, GABA_{mide} und dann zu GABA metabolisiert. PGB und seine aktiven Metaboliten binden sowohl an den GABA_A- als auch an den GABA_B-Rezeptor (Bowery und Mitarbeiter, 1982) und verdrängen radioaktiv markiertes $\langle^3\text{H}\rangle$ -Muscimol und $\langle^3\text{H}\rangle$ -GABA von ihren Bindungsstellen (Bartholini und Mitarbeiter, 1979; Lloyd und Dreksley, 1978). Im Zentralnervensystem werden derzeit zwei GABA-Rezeptorsubtypen unterschieden (GABA_A- und GABA_B-Rezeptor). Der GABA_A-Rezeptor ist mit dem Chloridkanal assoziiert. Diese Wirkung von GABA wird von Bicucullin, einem selektiven GABA_A-Antagonisten, antagonisiert. Picrotoxin antagonisiert die Wirkung von GABA über einen direkten Einfluß auf den Chloridkanal. Die Effekte von GABA können auch durch verschiedene konvulsiv

wirkende Substanzen (z.B. Pentetrazol und Penicillin) geblockt werden. Die physiologische Bedeutung des GABA_B-Rezeptors ist noch nicht bekannt. Baclofen (Lioresal^R) ist ein spezifischer GABA_B-Agonist. Ein zur Charakterisierung des GABA_B-Rezeptors notwendiger GABA_B-Antagonist wurde noch nicht gefunden.

Da PGB nicht wasserlöslich ist, verwendeten wir für die vorliegenden Untersuchungen seinen wasserlöslichen Metaboliten PGB SL 75102. PGB SL 75102 wurde in dieser Arbeit ausschließlich durch Mikrosuperfusion aus der Mikropipette freigesetzt. Auf die Entladung spontanaktiver und auf L-Glu-aktivierte Neurone hatte PGB nur einen sehr schwachen Effekt (siehe Abb. III.7-9), der nur nach einer längeren Latenzzeit auftrat. Durch PGB konnte jedoch in der Mehrzahl der untersuchten Neurone eine deutliche Verstärkung der GABA-induzierten Hemmung gezeigt werden (siehe z.B. Abb. III.7 und 8). Wie bei VAP und bei den Benzodiazepinen, beobachteten wir vereinzelt einen GABA-antagonistischen Effekt (siehe Abb. III.9).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Befunde stehen in Einklang mit anderen neurophysiologischen Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von PGB SL 7510. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß PGB seine GABAmimetische Wirkung durch eine Erhöhung der Chloridleitfähigkeit der Membran entfaltet, die auf einer Aktivierung des GABA-Rezeptors beruht (Bowery und Mitarbeiter 1985; Worms und Mitarbeiter, 1982) und die durch Bicucullin und Picrotoxin antagonisiert werden kann (Evans, 1976; Micheletti und Mitarbeiter, 1985). Diese Annahme wird ferner unterstützt durch den Nachweis, daß PGB die Benzodiazepin-Bindung (siehe unten) an der postsynaptischen Membran verstärkt

(Kenneth und Mitarbeiter 1982). Dieser Effekt wurde an in vitro- und in vivo-Präparationen gezeigt (Kenneth und Mitarbeiter, 1982). In den meisten Neuronen des Zentralnervensystems ist die Verteilung der Chloridionen auf beiden Seiten der postsynaptischen Membran so, daß das Gleichgewichtspotential für Chlorid negativer als das Ruhemembranpotential der Zelle ist. Folglich führt die GABA-induzierte Leitfähigkeitserhöhung für Chloridionen üblicherweise zu einer Hyperpolarisation.

IV.4. Die Wirkung der Benzodiazepine Chlordiazepoxid und Midazolam

In unserer Untersuchung verwendeten wir die wasserlöslichen Benzodiazepine Cdp_x und Mz. Die beiden Substanzen führten sowohl zu einer Verstärkung, überraschenderweise aber auch an manchen Neuronen zu einer Verminderung der spontanen oder induzierten Entladungstätigkeit (siehe Abb. III.10-14). Entsprechend sahen wir eine Verstärkung der GABA-induzierten Hemmung, ebenso wie eine Abschwächung der GABA-induzierten Hemmung durch die Benzodiazepine. Der Befund, daß sich beide Effekte durch den Benzodiazepin-Antagonisten Ro 15-1788 antagonisieren (siehe Abb. III.11+12), sprechen für eine spezifische Wirkung, die über den Benzodiazepin-Rezeptor vermittelt wird. Derzeit finden sich nur zur Erklärung der Benzodiazepin-induzierten Hemmung der Entladungsaktivität einzelner Neurone und der Verstärkung der hemmenden Wirkung von GABA in der Literatur Hinweise.

Mit Hilfe von radioaktiv markierten Benzodiazepinen (^3H -Diazepam und ^3H -Flunitrazepam) gelang es 1977, in Gewebekulturen von Neuronen des Zentralnervensystems, Benzodiazepin-Bindungsstellen zu identifizieren (Bosmann und Mitarbeiter, 1977; Braestrup und Mitarbeiter, 1977; Möhler und Okada, 1977b). Die höchste Konzentration von Benzodiazepin-Bindungsstellen findet sich im Neokortex (Möhler und Mitarbeiter, 1978; Squires und Braestrup, 1977). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen (Abb.III.10,12 und 14) haben elektrophysiologische Untersuchungen gezeigt, daß Benzodiazepine die Fähigkeit haben, die Wirkung des aktivierten GABA-Rezeptors zu verstärken. Dies geschieht entweder durch Veränderung des GABA-Rezeptors von einem Zustand erniedrigter Bindungsfähigkeit ("low affinity state") in einen Zustand erhöhter Bindungsfähigkeit ("high affinity state") oder durch Erhöhung der Effizienz der Kopplung zwischen dem GABA-Rezeptor und dem Chloridkanal (Haefely, 1983; Jahnsen and Laurssen, 1981; McBurney, 1984). Aus biochemischen Untersuchungen ist bekannt, daß Benzodiazepine die spezifische Bindung von GABA in vitro erhöhen (Costa und Mitarbeiter, 1978; Skerritt und Mitarbeiter, 1982). Es wird angenommen, daß der GABA-Rezeptor unter Ruhebedingungen durch ein endogenes Peptid, genannt GABAModulin, in einem "low affinity state", gehalten wird. Es wurde postuliert, daß Benzodiazepine den Effekt von GABAModulin hemmen oder es vom Rezeptorkomplex verdrängen. Ehlert und Mitarbeiter (1981) haben beobachtet, daß durch GABA auch eine Zunahme der Benzodiazepin-Bindung bewirkt wird (Ehlert und Mitarbeiter, 1981; Möhler und Mitarbeiter, 1982). Derzeit wird von der Vorstellung ausgegangen, daß der Benzodiazepin-Rezeptor, wenn er durch einen

agonistischen Liganden aktiviert wird, die Öffnungsfrequenz des Chloridkanals heraufsetzt (McBurney, 1984; Macdonald und Barker, 1978).

Von Polc und Mitarbeitern ist ein hypothetisches Benzodiazepin-GABA-Rezeptor-Modell aufgestellt worden (Polc und Mitarbeiter, 1982). Dieses Modell stellt den Benzodiazepin-Rezeptor als einen Supramolekularkomplex dar, bestehend aus dem GABA-Rezeptor, dem Benzodiazepin-Rezeptor und dem Chloridkanal. Aktivierung des GABA-Rezeptors durch GABA oder GABA-Agonisten führt zu einer Konformationsänderung (unter einer möglichen Beteiligung von GABAModulin) dieses Supramolekularkomplexes und schließlich zu einer Öffnung des Chloridkanals. Die Richtung der resultierenden Membranpolarisation wird durch den aktuellen elektrochemischen Gradienten für Chloridion bestimmt. Der Benzodiazepin-Rezeptor ist in diesem Modell eine separate molekulare Einheit, die funktionell zwischen dem GABA-Rezeptor und dem Chloridkanal liegt. Möglicherweise ist der Benzodiazepin-Rezeptor aber auch ein integraler Teil des GABA-Rezeptors (Polc und Mitarbeiter, 1982). Der molekulare Mechanismus, durch den Benzodiazepine die GABAerge synaptische Übertragung verstärken, bezieht immer eine Modifikation des GABA-Rezeptor/Chloridkanal-komplexes mit ein.

Wie in Abb.III.11 gezeigt, wird die GABA-induzierte Hemmung durch die Benzodiazepine auch an einigen Neuronen vermindert. Da diese Wirkung durch Ro 15-1788 antagonisierbar ist, handelt es sich bei dieser Wirkung um einen spezifischen Benzodiazepin-Effekt. Die GABA-antagonistische Wirkung von Benzodiazepinen wurde auch früher schon beschrieben (Gähwiler, 1976; Steiner und

Felix, 1976). Gähwiler (1976) zeigt in extrazellulären Ableitungen an Purkinje-Zellen des Kleinhirns eine GABA-antagonistische Wirkung von Diazepam und Cdpx. Macdonald und Barker (1978) haben gefunden, daß in Zellkulturen Benzodiazepine in geringen Konzentrationen die GABA-induzierte Hemmung verstärken, daß sie aber in höheren Konzentrationen diesen Effekt antagonisieren können. Die unterschiedliche Wirkungsweise der Benzodiazepine wäre nach diesen Ergebnissen dosisabhängig (Macdonald und Barker, 1978). In unseren Untersuchungen konnten wir jedoch an keinem Neuron eine dosisabhängige Änderung der Benzodiazepin-Wirkung zeigen (Abb.III.11). Sowohl durch Änderungen der Phoresestromstärke, als auch durch Konzentrationsänderungen in der Mikropipette ließ sich die Wirkung der Benzodiazepine auf die registrierten Neurone nicht umkehren.

IV.5. Die Toleranzentwicklung kortikaler Neurone gegenüber Benzodiazepinen

Intraperitoneale Gabe von 12 mg/kg Mz bewirkte eine Abnahme der Entladungstätigkeit des registrierten Neurons. Diese Abnahme wurde meist bereits nach wenigen Minuten sichtbar (siehe Abb. II.15). Die Entladungsrate kehrte häufig bereits nach weniger als einer Stunde auf den Ausgangswert zurück. Eine erneute intraperitoneale Injektion von Mz führte in keinem der Tests zu einer abermaligen Veränderung der Entladungen des registrierten Neurons. Die nach intraperitoneal appliziertem Mz ausgelöste Hemmung, konnte durch pneumatisch appliziertes Ro 15-1788 am

registrierten Neuron nicht antagonisiert werden. Nach intraperitonealer Gabe des Antagonisten Ro 15-1788, war jedoch immer eine deutliche Steigerung der spontanen Entladungstätigkeit zu sehen. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Entwicklung von Toleranz gegenüber Benzodiazepinen bereits nach einmaliger Gabe beginnt. Eine rasch einsetzende Toleranzentwicklung gegenüber der antikonvulsiven Wirkung von Benzodiazepinen wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Browne, 1976; Gent und Haigh 1983; Goldberg und Mitarbeiter, 1967; Lippa und Regan, 1977). Nach chronischer Benzodiazepin-Applikation wurde von Crawley (1982) eine Reduzierung der Benzodiazepin-Bindungsstellen (receptor down regulation) gezeigt. Die Dauer und das Ausmaß dieser Veränderung war abhängig von der Potenz der zuvor applizierten Benzodiazepine. Die Zahl der Bindungsstellen war nach Behandlung mit Clonazepam sehr viel länger reduziert als nach Behandlung mit Cdpx, das, verglichen mit Clonazepam, eine geringere Affinität zum Rezeptor aufweist (Crawley und Mitarbeiter, 1982). In weiteren Untersuchungen (Rosenberg und Chin, 1981) wurde nach chronischer Benzodiazepin-Vorbehandlung mit Clonazepam eine deutliche Reduzierung der Anzahl von Benzodiazepin-Bindungsstellen im Kortex und Hippocampus gefunden. In ihren Untersuchungen über die Wirkungen nach chronischer Applikation von Diazepam an Zellkulturen von Rückenmarksneuronen fanden Sher und Mitarbeiter (1983) eine Reduzierung der Anzahl der Benzodiazepin-Bindungsstellen, die mit einer verminderten Wirksamkeit von iontophoretisch appliziertem Diazepam einherging.

V. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußfolgerungen

1. Carbamazepin (CBZ) hemmt spontanaktive und durch L-Glutamat (L-Glu) aktivierte Neurone.
2. CBZ zeigt keine Interaktion mit iontophoretisch applizierter Gamma-amino-buttersäure (GABA).
3. Valproat (VAP) hemmt die Entladungen spontanaktiver und L- Glu-aktivierter Neurone.
4. VAP zeigt eine Verstärkung der hemmenden Wirkung von iontophoretisch appliziertem GABA.
5. Progabide (PGB) beeinflußt die Entladungstätigkeit spontanaktiver Neurone und L-Glu-aktivierter Neurone nicht.
6. PGB zeigt eine Verstärkung der durch GABA ausgelösten Hemmung.
7. Chlordiazepoxid (Cdpx) hemmt die Entladungen spontanaktiver und L-Glu aktivierter Neurone.
8. Cdpx verstärkt GABA-induzierte Hemmechanismen. Diese Effekte sind durch den Benzodiazepin-Antagonisten Ro 15-1788 antagonisierbar.
9. Midazolam (Mz) hemmt die Aktivität spontanaktiver und L-Glu-aktivierter Neurone.
10. Mz verstärkt die hemmende Wirkung von GABA. An einigen Neuronen trat eine Verminderung der hemmenden Wirkung von GABA auf.
11. Mz hemmt die Entladungstätigkeit der Neurone nach intraperitonealer Applikation. Toleranzentwicklung zeigte sich bereits nach einmaliger Applikation von Mz.

12. Der Benzodiazepin-Antagonist Ro 15-1788 hatte keinen Effekt auf spontanaktive und L-Glu aktivierte Neurone. Er antagonisiert die Wirkung von Benzodiazepinen auf iontophoretisch appliziertes GABA.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H.M. Emrich, der mir mit der Bereitstellung eines Stipendiums eine intensive Bearbeitung des gestellten Themas ermöglichte und zusammen mit Herrn Professor Dr. W. Zieglgänsberger die thematische Anregung zur vorliegenden Arbeit gab.

Herrn Professor Dr. W. Zieglgänsberger danke ich, für die Überlassung des Arbeitsplatzes und dafür, daß er mir mit seinem reichen Erfahrungsschatz auf dem Gebiet der Mikroiontophorese mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne seine Unterstützung wäre für mich die Durchführung der Experimente schwieriger und die Einarbeitungszeit wesentlich länger gewesen.

Ich danke Frau B. Bieletzki, die mich bei der Herstellung der Elektroden unterstützte und mir damit die Durchführung der Experimente erleichterte.

Frau I. v. Unruh danke ich für ihre Geduld und Ausdauer beim Schreiben der Arbeit.

München, Januar 1986

Johannes Vogler

LITERATUR

- Adamson, A.W., Physical Chemistry of Surfaces. Interscience, New York, 1960
- Anlezark, G.M., Horton, R.W., Meldrum, B.S., Sawaya, M.C.B. and Stephenson, J.D., Gamma-aminobutyric acid metabolism and the anticonvulsant action of ethanolamin-o-sulfate and di-n-propylacetate. Br. J. Pharmac. 56, 383-384 (1976)
- Armstrong, J.M., Fox, K., Kruk, Z.L. and Millar, J., Quantitative iontophoresis of catecholamines using multibarrel carbon fibre microelectrodes. J. Neurosci. Meth. 4, 385-406 (1981)
- Assumpcao, J.A., Bernardi, N., Brown, J. and Stone, T.W., Selective antagonism by benzodiazepines of neuronal responses to excitatory amino acids in the cerebral cortex. Br. J. Pharmac. 67, 563-568 (1979)
- Baldino, F. and Geller, H.M., Sodium valproate enhancement of GABA inhibition. J. Pharmacol. Exp. Ther. 217, 445-450 (1981a)
- Baldino, F. and Geller, H.M., Effect of sodium valproate on hypothalamic neurons in vivo and in vitro. Brain Res., 219, 231-237 (1981b)
- Bartholini, G., Friedmann, J.C., Langer, S.Z., Morselli, P.L. and Wick, A., Epilepsy and GABA Receptor Agonists. Basic and Therapeutic Research, Raven Press, New York, (1985)
- Bartholini, G., Scatton, B., Zirkovic, B. and Lloyd, K.G., On the mode of action of SL 76002, a new GABA agonist. In: GABA

- Neurotransmitter, P. Krogsgaard-Larsen, J. Scheeb-Krüger and H. Kojod (eds.), Munksgaard, Kopenhagen, 1979, pp. 326-340
- Bosmann, H.B., Case, K.R. and Distefano, P., Diazepam receptor characterization. Specific binding of a benzodiazepine to macromolecules in various areas of rat brain. FEBS Lett. 82, 368-372 (1977)
- Bossi, L.M., Beaussart, J.C., Fournier, V., Garel, S., Kurtz, D., Marescaux, C., Meaulle, F., Micheletti, G., Olsen, J., Orofianna, B., Vercelletto, P., Weiss, E. and Loiseau, P., Multicenter comparative trial of progabide versus sodium valproate in therapy-resistant epilepsies. In: L.E.R.S. Monograph Series, Vol. 3, Epilepsy and GABA Receptor Agonists Basic and Therapeutic Research, G. Bartholini et al. (eds.), Raven Press, New York, 1985, pp. 415-421
- Bowery, N.G., Hill, D.R. and Hudson, A.L., Evidence that SL 75102 is an agonist at GABA_B as well as GABA_A Receptors. Neuropharmacology, 21, 391-395 (1982)
- Bowery, N.G., Hill, D.R., Hudson, A.L. and Price, G.W., GABA mimetic action of SL 75102 at neuronal receptors. In: L.E.R.S. Monograph Series, Vol. 3, Epilepsy and GABA Receptor Agonists, G. Bartholini, P.L. Bossi, K.G. Lloyd and P.L. Morselli (eds.), Raven Press, New York, 1985, pp. 63-81
- Bradshaw, C.M., Pun, R.Y.K., Slater, N.T. and Szabadi, E., A procedure for comparing the mobilities of unlabelled drugs used in microelectrophoresis experiments. J. Pharmacol. 49, 667-677 (1981)

- Braestrup, C., Albrechtsen, R. and Squires, R.F., High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature* 269, 702-704 (1977)
- Braestrup, C. and Nielsen, U., Searching for endogenous benzodiazepine receptor ligands. *TIPS* 1, 424-427 (1980)
- Breimer, D., Jochemsen, R. and von Albert, H.H., Pharmacokinetics of benzodiazepines shortacting vs. longacting. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 30, 121-129 (1980)
- Brodmann, K., Vergleichende Lokalisation der Großhirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaus. Barth, Leipzig, 1909
- Browne, T.R., Clonazepam: a review of a new anticonvulsant drug. *Arch. Neurol.* 33, 326-332 (1976)
- Carraz, G., Fau, R., Chateau, R. and Bonnin, J., First clinical trials of the antiepileptic activity of n-dipropylacetic acid. *Ann. med. Psychol. (Paris)* 122, 577-584 (1964)
- Cereghino, J.J., Brock, J.T., Van Meter, J.C., Penry, J.K., Smith, L.D. and White, B.G., Carbamazepine for epilepsy. *Neurology* 24, 401-410 (1974)
- Chapman, A., Keane, P.E., Meldrum, B.S., Simiand, J. and Vernieres, J.C., Mechanisms of anticonvulsant action of valproate. *Progr. Neurobiol.* 19, 315-359 (1982)
- Codding, P.W. and Muir, A.K.S., Molecular structure of Ro 15-1788 and a model for the binding of benzodiazepine receptor ligand. *Mol. Pharmacol.* 28, 178-184 (1985)
- Cohn, J.B., Long and short acting benzodiazepines. A review of the role of benzodiazepines. In: *Benzodiazepines Divided*, M.R. Trimble (ed.), J. Wiley & Sons, Ltd., London, 1983, pp. 63-78

- Costa, E., Guidotti, A. and Mao, C.C., Evidence for the involvement of GABA in the action of benzodiazepines: studies on rat cerebellum. *Adv. Biochem. Pharmacol.* 14, 113-130 (1975)
- Costa, E., Guidotti, A. and Tofano, G., Molecular mechanisms mediating the action of diazepam on GABA receptors. *Br. J. Psychiatr.* 133, 239-248 (1978)
- Crawley, J.N., Marangos, P.J., Stivers, J. and Goodwin, F.K., Chronic clonazepam administration induces benzodiazepine receptor subsensitivity. *Neuropharmacology* 21, 85-89 (1982)
- Creutzfeldt, O.D., *Cortex Cerebri*, Springer Verlag, Berlin, 1983
- Cumin, R., Bonetti, E.P., Scherschlicht, R. and Haefely, W., Use of the specific benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 in studies of physiological dependence on benzodiazepines. *Experientia* 38, 833-834 (1982)
- Curtis, D.R., 'Microelectrophoresis'. In: *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. 5a, W.L. Nastuk (ed.), Academic Press, New York, 1964, pp. 144-190
- Davies, J.T. and Rideal, E.K., *Interfacial Phenomena*, Academic Press, London, 1961
- Del Castillo, J. and Katz, B., On the localization of acetylcholine receptors. *J. Physiol.*, London, 128, 157-181 (1955)
- Doenicke, A., Suthmann, H., Kapp, W., Kugler, J. und Ebentheuer, H., Zur Wirkung des Benzodiazepin-Antagonisten Ro 15-1788. *Anaesthesist* 33, 343-347 (1984)
- Eccles, J.C., *The Physiology of Nerve Cells*, John Hopkins Press, Baltimore-Oxford, University Press, London, 1957
- Eccles, J.C., *The Physiology of Synapses*, Springer Verlag, Berlin, 1964

- Economo, von, C., Zellaufbau der Großhirnrinde des Menschen, Springer Verlag, Berlin, 1927
- Ehlert, F.J., Roeske, W.R., Braestrup, C., Yamamura, S.H. and Yamamura, H.I., Gamma-aminobutyric acid regulation of the benzodiazepine receptor. Biochemical evidence for pharmacologically different effects of benzodiazepine and propyl- β -carboline-3-carboxylate. Eur. J. Pharmacol. 70, 593-596 (1981)
- Emrich, H.M., Zur Bedeutung von Benzodiazepin-Antagonisten in Klinik und Forschung. In: Therapie mit Benzodiazepinen - Ausblick und Rückblick, H. Hippus (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1986, pp. 41-46
- Emrich, H.M., Okuma, T. and Müller, A.A., Anticonvulsants in affective disorders. Excerpta Medica, Intern. Congr. Series 626 (1984)
- Enna, S.J. and Gallagher, J.P., Biochemical and electrophysiological characteristics of mammalian GABA receptors. Int. Rev. Neurobiol. 24, 181-212 (1983)
- Evans, R.W., Potentiation of the effects of GABA by pentobarbital. Brain Res. 171, 113-120 (1976)
- Evans, R.W. and Gualtieri, C.T., Carbamazepine, a neuropsychological and psychiatric profile. Clin. Neuropharmacol. 8, 221-241 (1985)
- Eymard, P., The conditions of the discovery of the anticonvulsant effects of sodium-valproate were described at a meeting of the French Society of Therapeutics and Pharmacodynamics on December 19, 1962, and subsequently published in the journal: Therapie 18, 435-438 (1963)

- Fagg, G.E. and Foster, A.C., Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9, 701-719 (1983).
- Fonnum, F. and Storm-Mathiesen, J., Localisation of GABA-ergic neurons in the CNS. In: *Handbook of Pharmacology*, Vol. 9, 1978, pp. 357-401,
- Gähwiler, B.H., Diazepam and chlordiazepoxide powerful GABA antagonists in explants of rat cerebellum. *Brain Res.* 107, 176-180 (1976)
- Gent, J.P. and Phillips, V.I., Sodium di-n-propylacetate potentiates responses to GABA and muscimol on single central neurones. *Brain Res.* 197, 275-278 (1980)
- Gent, J.P. and Haigh, J.R.M., Development of tolerance to the anticonvulsant effects of clobazam. *Eur. J. Pharmacol.* 94, 159-160 (1983)
- Godin, Y., Heiner, L., Mark, J. and Mandel, P., Effects of di-n-propylacetate, an anticonvulsant compound, on GABA metabolism, *J. Neurochem.* 16, 869-873 (1969)
- Goldberg, M.E., Manian, A.A. and Efron, D.E., A comparative study of certain pharmacologic responses following acute and chronic administration of chlordiazepoxide. *Life Sci.* 6, 481-491 (1967)
- Haefely, W., Benzodiazepine receptors; summary and commentary. In: *Pharmacology of Benzodiazepines*, E. Usdin, P. Skolnick, J.T. Tallman, D. Greenblatt and S.M. Paul (eds.), MacMillan, London, 1983, pp. 175-184
- Haefely, W., Kulcsar, A., Möhler, H., Pieri, L., Polc, P. and Schaffner, R., Possible involvement of GABA in the central

- actions of benzodiazepines. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 14, 131-151 (1975)
- Haefely, W., Kyburz, E., Gerecke, M. and Möhler, H., Recent advances in the molecular pharmacology of benzodiazepine receptors in the structure activity. Relationships of their agonists and antagonists. In: Pharmacological Research Department, HOFFMANN-LA ROCHE & Co., Ltd., CH-4200 Basel, 1985
- Harvey, P.K.P., Bradford, H.F. and Davison, A.N., The inhibitory effect of sodium n-dipropylacetate on the degradative enzymes of the GABA shunt. FEBS Lett. 52, 251-254 (1975)
- Heinemann, U., Franceschetti, S., Haman, B., Konnerth, A. and Yaari, Y., Effects of anticonvulsants on spontaneous epileptiform activity which develops in the absence of chemical synaptic transmission in hippocampal slices. Brain Res. 325, 349-352 (1985)
- Hernandez-Peon, R., Central action of G 32883 upon transmission of trigeminal pain impulses, Med. pharmacol. Exp. 12, 73-80 (1965)
- Herz, A., Zieglgänsberger, W. and Färber, G., Microelectrophoretic studies concerning spread of glutamate and GABA in brain tissue. Exp. Brain Res. 9, 221-235 (1969)
- Holm, E., Kelleter, R., Heinemann, H. und Haman, K.F., Elektrophysiologische Analyse der Wirkungen von CBZ auf das Gehirn der Katze. Pharmacopsychiat. Neuro-Psychopharmacol. 3, 187-200 (1970)
- Hood, T.W., Siegfried, J. and Haas, H.L., Analysis of carbamazepine actions in hippocampal slices of the rat. Cell. Molec. Neurobiol. 3/3, (1983)

- Hunkeler, W., Möhler, H., Pieri, L., Polc, P., Bonetti, E.P., Cumin, R., Schaffner, R. and Haefely, W., Selective antagonists of benzodiazepines. *Nature* 290, 514-516 (1981)
- Jahnsen, V.A. and Laursen, A.M., The effect of benzodiazepine on the hyperpolarizing and depolarizing responses of hippocampal cells to GABA. *Brain Res.* 207, 214-217 (1981)
- Johnston, G.A.R., Kennedy, S.M.E. and Lodge, D., Muscimol uptake release and binding in rat brain slices. *J. Neurochem.* 31, 1519-1523 (1978)
- Julien, R.M. and Hollister, R.P., Carbamazepine: Mechanism of action. *Adv. Neurol.* 11, 263-277 (1975)
- Kahle, W., Leonhardt, H. und Platzter, W., Taschenatlas der Anatomie, Bd. 3, Thieme Verlag, Stuttgart, 1979
- Kenneth, G.L., Arbilla, S., Beaumont, K., Briley, M., De Montis, G., Scatton, B., Langer, S.Z. and Bartholini, G., GABA receptor stimulation. II. Specificity of progabide (SL 76002) and SL 75102 for the GABA receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220, 672-677 (1982)
- Kerwin, R.W., Olpe, H.R. and Schmutz, M., The effect of sodium-n-dipropylacetate on gamma-aminobutyric acid dependent inhibition in the rat cortex and substantia nigra in relation to its anticonvulsant activity. *Br. J. Pharmac.* 71, 545-551 (1980)
- König, J.F.R. and Klippel, R.A., The Rat Brain; a Stereotactic Atlas, Williams and Wilkins Comp., Baltimore, 1963
- Krnjevic, K. and Phillis, J.W., Ionophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex, *J. Physiol., London*, 165, 274-304 (1963)

- Kruk, Z.L., Armstrong-James, M. and Millar, J., Measurement of the concentration of 5-HT ejected during iontophoresis using multibarrel carbon fibre microelectrodes. *Life Sci.* 27, 2093-2098 (1980)
- Krupp, P., The effect of tegretol on some elementary neuronal mechanisms. *Headache* 9, 42-46 (1969)
- Lippa, A.S. and Regan, B., Additional studies on the importance of glycine and GABA in mediating the actions of benzodiazepines. *Life Sci.* 21, 1779-1784 (1977)
- Lloyd, K.G. and Dreksley, S., Analysis of 3H-gamma-aminobutyric acid (GABA) binding in the human brain. *Brain Res.* 163, 77-78 (1978)
- Löscher, W.N. und Frey, H.-H., Zum Wirkungsmechanismus von Valproinsäure. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 27, 1081-1082 (1977)
- McBurney, R.N., Membrane actions of GABA in cultured central neurones. In: *Actions and Interactions of GABA and Benzodiazepines*. N.G. Bowey (ed.), Raven Press, New York, 1984, pp. 43-58
- Macdonald, R. and Barker, J.L., Benzodiazepines specifically modulate GABA mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurones. *Nature* 271, 563-564 (1978)
- Macdonald, R. and Bergey, K.B., VPA acid augments GABA mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurones. *Brain Res.* 170, 558-562 (1979)
- Micheletti, G., Marescaux, C., Vergnes, M., Rumbach, L. and Warter, J.M., Effects of GABA mimetics and GABA antagonists on spontaneous nonconvulsive seizures in wistar rats. In:

- L.E.R.S. Monograph Series, Vol. 3, Epilepsie and GABA Receptor Agonists, G. Bartholini et al. (eds.), Raven Press, New York, 1985, pp. 129-137
- Möhler, H. and Okada, T., Benzodiazepine receptors: Demonstration in the central nervous system. *Science* 198, 849-851 (1977a)
- Möhler, H. and Okada, T., Properties of 3H-diazepam binding to benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex. *Life Sci.* 20, 2101-2110 (1977b)
- Möhler, H., Okada, T., Heitz, P. and Ulrich, J., Biochemical identification of site of action of benzodiazepines in human brain by 3H-diazepam binding. *Life Sci.* 22, 985-986 (1978)
- Möhler, H., Sieghart, W., Polc, P., Bonetti, E.B. and Hunkeler, W., Differential interaction of agonist and antagonist with benzodiazepine receptors. In: *Pharmacology of Benzodiazepines*, E. Usdin, P. Skolnick, J.F. Tallmann, D. Greenblatt and S.M. Paul (eds.), Macmillan, London, 1982, pp. 63-70
- Morselli, P.L. and Bossi, L., Carbamazepine: absorption, distribution and excretion. In: *Antiepileptic Drugs*, D.M. Woodbury, J.K. Penry and C.E. Pippenger (eds.), Raven Press, New York, 1982, pp. 465-482
- Morselli, P.L. and Frigerio, A., Metabolism and pharmacokinetic studies of carbamazepine. *Drug Metab. Rev.* 4, 97-113 (1975)
- Nastuk, W.L., Membrane potential changes at a single muscle endplate produced by transitory application of acetylcholine with an electrically controlled microjet. *Fed. Proc.* 12, 102 (1953)

- Olpe, H.R., Baudry, M. and Jones, S.G.R., Electrophysiological and neurochemical investigations on the action of carbamazepine on the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 110, 71-80 (1985)
- Palmer, M.R., Micropressure ejection: a complementary technique to microiontophoresis for neuropharmacological studies in mammalian CNS. *J. Electrophys. Techn.* 9, 123-139 (1982)
- Phillis, J.W., Interactions of the anticonvulsants diphenylhydantoin and carbamazepine with adenosine on cerebral cortical neurons. *Epilepsia* 25, 765-772 (1984)
- Pinder, R.M., Brodgen, R.N., Speight, T.M. and Avery, G.S., Sodium valproate: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Drugs* 13, 81-123 (1977)
- Polc, P., Bonetti, E.P., Schaffner, R. and Haefely, W., A three state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788, benzodiazepine tranquillizers, β -carbolines and phenobarbitone. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 321, 260-264 (1982)
- Post, R.M., Uhde, T.W., Putnam, F.W., James, C., Ballenger, J.T. and Berretini, W.H., Kindling and carbamazepine in affective illness. *J. Nerv. Ment. Dis.* 170, 717-729 (1982)
- Purdy, R.E., Julien, R.M., Fairhurst, A.S. and Terry, M.D., Effect of carbamazepine on the in vitro uptake and release of norepinephrine in adrenergic nerves of rabbit aorta and in whole brain synaptosomes. *Epilepsia* 18, 251-257 (1977)
- Purves, R.P., *Microelectrode Methods for Intracellular Recording and Iontophoresis*, Academic Press, London-New York, 1981

- Roberts, E., Chase, N.T. and Donald, B.T., GABA in Nervous System Function, Kroc Foundation Series, Vol. 5, Raven Press, New York, 1976
- Rockel, A.J., Hirus, R.W. and Powell, T.P.S., The basic uniformity in structure of the neocortex. Brain 103, 221-244 (1980)
- Rosenberg, H.C. and Chin, T.H., Tolerance during chronic benzo-diazepine treatment associated with decreased receptor binding. Eur. J. Pharmacol. 70, 453-460 (1981)
- Sawaya, M.C.B., Horton, R.W. and Meldrum, B.S., Effect of anti-convulsive drugs on the cerebral enzymes metabolizing GABA. Epilepsia 16, 649-652 (1975)
- Schauf, C.L., Davies, F.A. and Marder, J., Effects of carbamazepine on the ionic conductance of myxicola giant axons. J. Pharmacol. Exp. Ther. 189, 533-543 (1974)
- Schmidt, D., Zur GABA-Hypothese von Epilepsien. Klinische und experimentelle Aspekte. 120. Nervenärztl. Kolloquium, 16.10.85, Psychiatr. Klin. Univ. München
- Schmidt, R.F. und Thews, G., Physiologie des Menschen, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1980
- Schmidt, R.F., Vogel, M.E. und Zimmermann, M., Die Wirkung von Diazepam auf die praesynaptische Hemmung und andere Rückenmarksreflexe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 258, 69-82 (1967)
- Schmutz, M., Olpe, H.R. and Koella, W.P., Central actions of valproate sodium. J. Pharm. Pharmac. 31, 413-414 (1979)
- Schobben, F., Krec, T.B., Van der Kleyn, E., Claersens, R. and Reiner, W.O., Metabolism of valproic acid in monkey and man. In: Antileptic Therapy: Advances in Drug Monitoring, S.I.

- Johanersen, I. Svein, P.L. Morselli, C.E. Pippinger, A. Riechens, D. Schmidt and H. Meinardi (eds.), Raven Press, New York, 1980, pp. 91-102
- Shaw, D.J., Electrophoresis, Academic Press, New York, 1969
- Sher, P.K., Study, R.E., Maretta, J., Baker, J.L. and Nelson, P.G., Depression of benzodiazepine binding and diazepam potentiation of GABA mediated inhibition after chronic exposure of spinal cord cultures to diazepam. *Brain Res.* 268, 171-176 (1983)
- Sillanpaa, M., Carbamazepine: Pharmacology and clinical uses. *Acta Neurol. Scand.* 64, Suppl. 88, 1-202 (1981)
- Simler, S., Ciesielski, L., Maitre, M., Randrianarisoa, H. and Mandel, P., Effect of sodium n-dipropylacetate on audiogenic seizures and brain gamma-aminobutyric acid levels. *Biochem. Pharmacol.* 22, 1701-1708 (1973)
- Simon, D. and Penry, J.K., Sodium di-n-propylacetate (DRA) in the treatment of epilepsy. A review. *Epilepsia* 16, 549-573 (1975)
- Skeritt, J.H., Willow, U. and Johnston, G.A.R., Diazepam enhancement of low affinity GABA binding to rat brain membranes. *Neurosci. Lett.* 29, 63-66 (1982)
- Squires, R.F. and Braestrup, C., Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 266, 732-734 (1977)
- Steiner, F.A., Neurotransmitter und Neuromodulatoren, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1971
- Steiner, F.A. and Felix, D., Antagonistic effects of GABA and benzodiazepines on vestibular and cerebellum neurons, *Nature* 260, 346-347 (1976)

- Stone, T.W., Microiontophoresis and pressure ejection. In: IBRO Handbook Series: Methods in the Neurosciences, Vol. 8, A Wiley-Interscience Publication, New York, 1985
- Suria, A. and Killam, K.E., Carbamazepine. In: Antiepileptic Drugs: Mechanisms of Action, G.H. Glaser, J.K. Penry and D.M. Kloobury (eds.), Raven Press, New York, 1980, pp. 563-577
- Theobald, W. und Kunz, H.A., Zur Pharmakologie des Antiepileptikums. *Arzneim.-Forsch.* 13, 122-125 (1963)
- Thompson, R.F. and Patterson, M.M., Methods in Physiological Psychology, Part A, Academic Press, New York, 1973, pp. 3-38
- Ticku, M.K. and Davis, W.C., Effect of valproic acid on ^3H -diazepam and ^3H -dihydropicrotoxin on binding sites at the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Brain Res.* 223, 218-222 (1981)
- Tower, D.B., GABA and seizures: clinical correlates in man. In: GABA in Nervous System Function, E. Roberts, T.N. Chase and D.B. Tower (eds.), Raven Press, New York, 1976, 461-478
- Van der Laan, J.W., de Boer, T. and Bruinvals, J., Di n-propylacetate and GABA degradation preferential inhibition of succinic-semialdehyd dehydrogenase and indirect inhibition of GABA transaminase. *J. Neurochem.* 32, 1767-1780 (1975)
- Van Duijn, H. and Beckmann, M.K.F., Dipropylacetic acid (Dekapime) in experimental epilepsy in the alert cat. *Epilepsia* 16, 83-90 (1975)
- Worms, P., Depoortere, H., Durand, H., Morselli, P.L., Lloyd, K.G. and Bartholini, G., Gamma-aminobutyric acid (GABA)

- receptor stimulation. Neuropharmacological profiles of proga-
bide SL 76.002 and SL 75.102 with emphasis on their anticon-
vulsant spectra. J. Pharmacol. Exp. Ther. 220, 660-671 (1982)
- Ziegler, W.H. and Schalch, E., Antagonism of benzodiazepine
induced sedation in man. In: Sleep, W.P. Koella (ed.), Kar-
ger, Basel, 1983, pp. 427-429
- Zieglgänsberger, W., French, E.D., Siggins, G.R. and Bloom,
F.E., Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons
by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. Science 205,
415-417 (1979)
- Zieglgänsberger, W., Herz, A. and Teschemacher, H.J., Electro-
phoretic release of tritium-labelled glutamic acid from
micropipettes in vitro. Brain Res. 15, 298-300 (1969)
- Zieglgänsberger, W. and Puil, E., Action of glutamatic acid on
spinal neurones. Exp. Brain Res. 17, 35-49 (1973)
- Zieglgänsberger, W., Sothmann, G. and Herz, A., Iontophoretic
release of substances from micropipettes in vitro.
Neuropharmacology 13, 417-422 (1974)

Lebenslauf

Am 7.12.1951 wurde ich als erstes von sechs Kindern meiner Eltern Hermann Vogler und Elisabeth Vogler (geborene Hilpert) in Duisburg geboren. Nach meinem Volksschulbesuch trat ich 1962 in das neusprachliche Lessing-Gymnasium in Mannheim ein, an dem ich 1971 das Abitur machte. Ich leistete im Anschluß an die Schulzeit meinen zivilen Ersatzdienst im Städt. Krankenhaus in Mannheim und konnte dort gleichzeitig eine Ausbildung als Krankenpflegehelfer machen, die ich im März 1973 mit dem Staatsexamen abschloß. Danach studierte ich in Heidelberg Medizin und erlangte die Approbation als Arzt im April 1980. Zunächst arbeitete ich drei Jahre als Assistenzarzt und Psychotherapeut in der Psychosomatischen Klinik in Grönenbach/Allg. und bildete mich in verschiedenen Psychotherapieverfahren der Humanistischen Psychologie aus. Im Oktober 1984 begann ich in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. med. W. Zieglgänsberger meine Dissertation und setze jetzt in der Klinik des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie meine Ausbildung zum Facharzt für Psychiatrie fort.

München, Februar 1986

Johannes Vogler

